

1127-13

CARYOLOGIA

Giornale di Citologia, Citosistemica e Genetica
Journal of Cytology, Cytosystematics and Genetics

Fondato
da
ALBERTO CHIARUGI



Editore e Direttore:
EMILIA MESSERI CHIARUGI

Condirettore resp. e Redattore:
FERNANDO FABBRI

Comitato di consulenza scientifica:

EMILIO BATTAGLIA
MARIO BENAZZI
VINCENZO CHIARUGI
GIUSEPPE COLOSI
ROBERTO CORTI

FRANCESCO D'AMATO
ELEONORA FRANCINI CORTI
GIUSEPPE MARTINOLI
ALBINA MESSERI
EMANUELE PADOA

RODOLFO PICHI-SERMOLLI

MAIO - APRILE 1961

VOLUME 14 - NUMERO 1

LA FORMAZIONE DEI FOGLIETTI EMBRIONALI, L'ORIGINE DELL'EPITELIO INTESTINALE E LA DETERMINAZIONE DELLA LINEA GERMINALE FEMMINILE NELL'HAPLOEMBIA SOLIERI

RENZO STEFANI

Istituto di Zoologia dell'Università, Cagliari

In Redazione: il 3 Febbraio 1961

SOMMARIO

| | | |
|---|------|----|
| INTRODUZIONE | Pag. | 1 |
| GLI STADI DI SVILUPPO PRECEDENTI LA FORMAZIONE DELLA PIASTRA GERMINATIVA | » | 3 |
| PROCESSI DI GASTRULAZIONE E LA FORMAZIONE DEI FOGLIETTI EMBRIONALI | | |
| — Sguardo storico | » | 4 |
| — La formazione dello strato interno | » | 8 |
| — La segmentazione dell'embrione e la formazione del mesoderma splanchnico | » | 13 |
| — La formazione dell'epitelio mesenterico | » | 14 |
| — La partecipazione delle cellule vitelline alla formazione della parete mesenterica | » | 18 |
| — Discussione | » | 22 |
| LA DETERMINAZIONE DELLA LINEA GERMINALE FEMMINILE | » | 24 |
| — La prima comparsa delle cellule germinali nell'Haploembia | » | 25 |
| — La formazione degli abbozzi ovarici | » | 28 |
| BIBLIOGRAFIA | » | 28 |
| SUMMARY | » | 29 |
| RASSUNTO | » | 30 |

INTRODUZIONE

Le nostre conoscenze sullo sviluppo embrionale degli Embiotteri sono scarse. Il KERSHAW in una nota del 1914 descrive la formazione degli annessi embrionali in *Embia uhrischi* e fornisce alcuni dati sulla blastocinesi e sulla posizione dell'embrione nell'uovo. Non mi consta che altre ricerche di embriologia su questo gruppo siano state compiute.

In un mio lavoro precedente (1959), apparso in questa Rivista, ho descritto i processi della fecondazione e della segmentazione dell'uovo fino alla formazione della piastra germinativa, con particolare riguardo ai fenomeni cariologici che in questi stadi di sviluppo avvengono sia nell'uovo fecondato che nell'uovo vergine.

L'estensione dell'indagine kariologica ai successivi stadi embrionali, implicando la conoscenza dei normali processi di sviluppo, mi ha in certo modo obbligato ad analizzare alcuni aspetti più importanti e più discussi della embriologia degli insetti vale a dire quelli della gastrulazione, della formazione dei foglietti embrionali, e quelli riguardanti la determinazione della linea germinale.

L'analisi morfologica è stata effettuata su embrioni di *Haploembia solieri* anfigonica e partenogenetica, ma sono stati esaminati, a scopo comparativo, anche embrioni di altri embiotteri (*Haploembia palau* e *Parthenembia reclusa*). Si è sempre riscontrata uniformità di comportamento riguardo ai processi trattati. Le uova non sono state incubate artificialmente. La deposizione è avvenuta in condizioni naturali di temperatura e di umidità.

È noto come nelle ricerche di embriologia descrittiva si possono adottare, per la denominazione degli stadi, due diversi criteri: il criterio cronologico e quello morfologico. Come ben disse il GRANDORI per il baco da seta (1932) ed io qui riconfermo per l'*Haploembia solieri*, il criterio cronologico è manchevole, sia perchè esiste un diverso grado di capacità individuale di sviluppo sia perchè i fattori esterni influenzano in modo vario la velocità di sviluppo dell'uovo. Il criterio morfologico invece è veramente razionale e non permette equivoci. Io mi riferirò fondamentalmente a quest'ultimo ma terrò conto, a scopo indicativo, anche dell'età degli embrioni.

Ricorderò a questo proposito che lo sviluppo embrionale completo, dalla deposizione alla schiusa, dura in media 37 giorni, in condizioni normali. La segmentazione dell'uovo si svolge nei primi 4 giorni circa, la piastra germinativa si costituisce al 6° giorno e la blastocinesi avviene in genere al 20° giorno. I dati cronologici riguardanti gli altri stadi di interesse particolare verranno via via riferiti nella trattazione dei vari argomenti.

Per quanto riguarda la tecnica istologica, sono state esaminate serie complete di sezioni trasversali, sagittali e frontali, allestite secondo i metodi classici. I preparati vennero per lo più colorati con l'Ematossilina Carazzi accoppiata alla Feulgen. Questo accoppiamento si è dimostrato particolarmente proficuo in quegli stadi di sviluppo nei quali era necessaria una perfetta evidenziazione delle sottilissime membrane e della struttura dei nuclei a basofilia estremamente debole. Il solo Carnoy è stato usato come fissativo per tutti gli stadi.

Di pari passo si sono esaminati embrioni in toto colorati con laorceina acetica. In questo campo è stata apportata una innovazione consistente nell'affettamento di interi embrioni, precedentemente fissati, colorati ed inclusi in CARBOVAX, in tre o quattro grosse sezioni. Tale tecnica ha permesso di seguire con maggior evidenza l'andamento dello sviluppo di organi che per la loro localizzazione interna mal si prestavano ad una visione di insieme in embrioni colorati in toto ed esaminati interi.

La tecnica dello schiacciamento è stata di decisivo aiuto nella analisi dei processi di divisione delle cellule vitelline durante la formazione dell'epitelio mesenterico.

Le figure rappresentano uova ed embrioni di *Haploembia solieri*. I disegni sono stati eseguiti alla camera lucida.

GLI STADI DI SVILUPPO PRECEDENTI LA FORMAZIONE DELLA PIASTRA GERMINATIVA

Come ho descritto ampiamente altrove (STEFANI 1956, 1959), l'uovo degli Embiotteri è fornito di un opercolo e di un micropilo e presenta una simmetria bilaterale semplice che permette una facile orientazione e la distinzione di un polo opercolare o anteriore, un polo antiopercolare o posteriore, un lato ventrale corrispondente alla parte ventrale dell'embrione nella sua posizione definitiva ed infine un lato dorsale, opposto al primo.

L'anfimissi, nell'uovo fecondato, avviene normalmente dopo 4-5 ore dalla deposizione. Le cellule di segmentazione, raggiunto lo stadio di 128 blastomeri, migrano alla superficie. La migrazione è simultanea. Rimangono nel tuorlo alcune di esse che, differenziandosi, daranno origine alle *cellule vitelline primarie*. Alla superficie si forma un *epitelio primario* o *blastoderma*, uniforme nella sua costituzione morfologica in ogni sua parte. Non esistono localizzazioni di particolari cellule (per es. cellule germinali in oosoma) nè si notano zone dell'uovo a struttura morfologicamente differenziata. Non si ha neppure la cosiddetta segmentazione secondaria del tuorlo.

Dal blastoderma già formato, alcune cellule rientrano negli strati sottostanti differenziandosi (*cellule vitelline secondarie*). I vitellofagi (comprendendo con questo termine le cellule vitelline, sia primarie che secondarie), subiscono un progressivo aumento volumetrico, assumono un aspetto ameboide e nei loro nuclei si mettono in evidenza fenomeni endomitotici con successivo aumento del numero dei nucleoli (da due, numero tipico dei nuclei diploidi, a 4 e 6) (STEFANI 1959). Dopo tale loro differenziazione queste grosse cellule non subiscono più mitosi. Alcuni autori hanno però descritto fenomeni di divisione diretta a loro carico, che io ho riscontrato non durante la segmentazione ma in un periodo molto tardivo, poco prima della schiusa, come riferirò in altro capitolo.

In base al numero dei nucleoli, agli aspetti morfologici del processo endomitotico ed anche, secondariamente, al volume nucleare, ammetto che la poliploidia nei vitellofagi si mantenga al livello tetraploide o esaploide.

Una distinzione morfologica tra cellule vitelline primarie e secondarie non è possibile.

Simili ai vitellofagi per struttura, ma di forma appiattita, sono i *paraciti*, cellule secondarie provenienti dalla piastra germinativa e localizzate tra questa ed il tuorlo, in uno strato ooplasmatico intermedio. Non esiste negli Embiotteri una membrana delle cellule vitelline (*yolk cell membrane*) descritta da alcuni autori per altri insetti.

La piastra germinativa si forma per intensa riproduzione cellulare in due aree ventrali simmetriche del blastoderma e per loro successiva convergenza verso la linea ventrale mediana (cfr. STEFANI 1959).

Il blastoderma extra-embrionale dà origine alla sierosa mentre la membrana amniotica si va formando subito dopo la costituzione della piastra germinativa mediante una piega sieroso-amniotica al margine posteriore della stessa e di due pieghe simmetriche laterali anteriori (Figg. 1 e 2) le quali, concrescendo, finiscono per fondersi determinando internamente la cavità amniotica ed esternamente ad essa uno spazio sottosieroso, comunicante con il resto del tuorlo.

La piastra germinativa è costituita in un primo tempo da un epitelio irregolarmente monostratificato in cui vi è intensa moltiplicazione cellulare.

I PROCESSI DI GASTRULAZIONE E LA FORMAZIONE DEI FOGLIETTI EMBRIONALI

Sguardo storico.

Uno dei problemi più dibattuti dell'embriologia degli insetti è quello riguardante i processi di gastrulazione e la formazione dei foglietti embrionali. La particolare formazione della blastula, per migrazione alla periferia delle cellule di segmentazione e la presenza di una grande quantità di tuorlo, avrebbero determinato in questi artropodi, secondo alcuni autori, una distorsione o degenerazione dei primi processi di sviluppo embrionale tipici dei metazoi, mascherando i normali fenomeni gastrulari.

La disparità di vedute riguarda soprattutto i seguenti punti:

1. Lo stadio di sviluppo in cui le cellule di segmentazione si trovano alla periferia dell'uovo e quivi formano l'epitelio primario o blastoderma.
2. La formazione di un solco gastrulare e di una successiva invaginazione.
3. Il destino delle cellule vitelline.
4. L'origine dell'epitelio mesenterico.

Esaminiamo innanzitutto la formazione dell'epitelio mesenterico. Le teorie principali sostengono che:

- a) L'intestino medio deriva unicamente dalle cellule vitelline.
- b) L'intestino medio è di origine ectodermica.
- c) L'intestino medio è in parte di derivazione ectodermica, in parte ha origine dalle cellule vitelline.
- d) L'intestino medio è un derivato del foglietto interno (entomesoderma).

DOHRN (1866) fu il primo a considerare le cellule vitelline come entoderma primario in quanto queste si differenzierebbero precocemente ed infine andrebbero a costituire l'epitelio del mesentero. Lo stadio comunemente detto *blastula* dovrebbe essere interpretato una gastrula essendo la gastrulazione rappresentata da quel fenomeno diffuso di migrazione verso l'interno di alcune cellule dell'epi-

telio primario che costituiscono tutti o parte dei vitellofagi, a seconda dei gruppi sistematici. Solchi che successivamente si formano durante la formazione dello strato interno sarebbero fenomeni secondari.

Questa teoria fu accolta da BOBRETSKI, BALFOUR, HERTWIG, PATTEN, AYERS, WILL e più recentemente da STUART (1935).

HEYMONS (1895), in parziale accordo con DOHRN, considera i vitellofagi quale entoderma primitivo ma distingue gli apterigoti dai pterigoti. Nei primi, come del resto anche nei miriapodi, l'epitelio mesenterico deriva direttamente dalle cellule vitelline e quindi è di origine entodermica. Nei pterigoti (Ortotteri, Mantodei, Blattodei) l'autore riconosce una origine ectodermica dell'epitelio mesenterico il quale si forma da cellule derivate dalle due invaginazioni proctodeale e stomodeale. HEYMONS considera pertanto l'entoderma primario, rappresentato dalle cellule vitelline, come arcaico e non più funzionale se non nelle forme primitive degli insetti. L'epitelio mesenterico nei pterigoti, di origine secondaria e recente, proviene dall'ectoderma.

Circa l'origine ectodermica dell'intestino medio, le vedute di HEYMONS vennero accettate da FRIEDERICHs, LECAILLON, RABITO, SCHWARTZE, TOYAMA, DEGENER, CZERSKI e più recentemente da ROONWAL (1937).

Altri autori sostengono, in diversa maniera, una doppia origine dell'epitelio mesenterico. La TSCHUPROFF (1903) trova in alcuni Odonati, che i vitellofagi danno origine all'epitelio intestinale nella sola parte mediana del tratto mesenterico, mentre nelle sue estremità anteriore e posteriore l'epitelio è di derivazione ectodermica stomodeale e rispettivamente proctodeale.

BUTT (1941) riprendendo gli studi sugli stessi Odonati riconferma i reperti della TSCHUPROFF nel senso che le cellule ectodermiche non migrano al di là dei due terzi anteriore e posteriore dell'intestino medio. La parte mediana, occupata da cellule vitelline nell'ultimo periodo embrionale e al momento della schiusa, verrebbe però successivamente e progressivamente invasa dall'ectoderma che si sostituirebbe gradualmente al tratto intermedio durante tutto il primo stadio larvale.

HOFFMANN (1914) dimostra in *Xenos* che, mentre l'intestino medio definitivo deriva dall'ectoderma, per proliferazione stomo-proctodeale, esso è preceduto da un intestino medio formato da cellule vitelline. NOSKIEWICZ e POLUSZYNSKI (1928) sono giunti alle stesse conclusioni per un altro Strepsittero (*Stylops*) ammettendo un entoderma primario vitellino fugace ed un epitelio mesenterico definitivo di origine ectodermica.

GRANDORI (1932) studiando lo sviluppo embrionale del baco da seta, ammette pure una origine mista, ectodermica e vitellina, dell'epitelio mesenterico.

Altri autori, pur riconoscendo la derivazione dell'epitelio mesenterico dalle inflessioni stomo-proctodeali, non accettano, per ragioni teoriche, l'idea di un intestino di origine ectodermica. Così HEIDER ammette l'esistenza di un *entoderma*

latente rappresentato da gruppi di cellule entodermiche localizzate nelle invaginazioni stomodeale e proctodeale, morfologicamente indistinguibili da quelle ectodermiche le quali, ad un determinato momento, per proliferazione, formerebbero l'epitelio definitivo. L'idea dell'entoderma latente fu ulteriormente elaborata da JOHANNSEN (1929). Del resto anche NUSBAUM e FULINSKI (1909), accesi sostenitori dell'origine ento-mesodermica dell'epitelio mesenterico, ammettono, in uno dei sette tipi di formazione del mesoderma, un tratto di natura entodermica latente nel foglietto primario.

HENSON (1932) ha omologato le invaginazioni stomo e proctodeale con i tratti orale ed anale del blastoporo di *Peripatus* ammettendo la natura entodermica di tali invaginazioni.

RICHARDS (1932) accorda le sue vedute con quelle di JOHANNSEN ma successivamente introduce il concetto di « significato prospettico » per cui cellule, non importa di quale derivazione esse siano, che si trovino in quel determinato territorio al momento della formazione dell'organo (nel caso nostro alle estremità delle invaginazioni stomo-proctodeali) saranno determinate a formare gli abbozzi mesenterici ⁽¹⁾ e successivamente costituiranno l'epitelio intestinale medio.

Abbiamo infine la teoria, emessa dal KOWALEWSKY, basata sui reperti ottenuti dal GRASSI nei suoi studi sull'ape (1885), della natura entomesodermica del foglietto interno (*inner layer*). Le cellule vitelline non prendono parte alcuna alla costituzione del mesentero. Il foglietto interno rappresenta l'abbozzo comune del meso- e dell'entoderma. Tale abbozzo è suddiviso in tre parti: una mediana longitudinale e due terminali. Il cordone mediano rappresenta il mesoderma, i due abbozzi terminali l'entoderma.

La costituzione dell'epitelio mesenterico si avrebbe quindi per proliferazione e migrazione di cellule provenienti da questi due abbozzi entodermici contigui all'ectoderma procto- stomodeale, ma non da quest'ultimo. Tale teoria ha trovato credito tra molti embriologi che vedono così salva la teoria dei foglietti germinali. Citiamo tra questi: HEIDER, WHEELER, HIRSCHLER, CHOLODKOWSKY, NUSBAUM e FULINSKI, ecc.

Spesso, diversi autori hanno ammesso, per una stessa specie, una genesi ora ectodermica ora entodermica dell'epitelio intestinale. Classico il caso del Grillo-talpa, studiato da HEYMONS e da NUSBAUM, quello altrettanto clamoroso ai suoi tempi, dell'*Hydrophilus piceus* studiato da HEIDER e da DEEGENER ed altri ancora.

Questa disparità di vedute si spiega con la difficoltà pratica di distinguere morfologicamente, nei preparati per sezione, in corrispondenza delle invaginazioni stomo-proctodeali, l'abbozzo di eventuali cellule ento-mesodermiche da

(1) Come nei testi di entomologia (cfr. GRANDI: *Introduzione allo studio della Entomologia*), l'aggettivo « mesenterico » si riferisce al mesentero o intestino medio e non ad un mesentere che negli insetti non esiste.

nelle che costituiscono la parete, indubbiamente ectodermica, delle invaginazioni esse e successivamente, nello stabilire se le proliferazioni cellulari epiteliali del mesentero derivino dalle prime o dalle seconde.

Per quanto riguarda la partecipazione delle cellule vitelline alla costituzione dell'intestino medio, anche qui grandi difficoltà si incontrano. Tra queste il significato da attribuire ad uno pseudoepitelio (*Dotterzellenschicht*) che le cellule vitelline formano in molti insetti negli ultimi stadi di sviluppo embrionale a contatto della parete mesenterica.

Sul destino di queste formazioni e sul loro valore morfogenetico le opinioni degli autori non sono chiare. Ancora, queste formazioni a volte si costituiscono negli ultimi momenti della vita embrionale e sono fugaci, altre volte lo strato di vitellofagi si mantiene a lungo dopo la schiusa, o fino a che la larva inizia a cibarsi. I nuclei subiscono in questo periodo delle divisioni, il citoplasma si vacuolizza e va incontro a particolari modificazioni sulla cui natura quasi nulla si sa.

Ci rimane ancora da esaminare brevemente le varie opinioni degli autori sui fenomeni di gastrulazione negli Insetti.

Generalmente ne vengono riconosciuti tre tipi fondamentali: un primo tipo, comune tra i Ditteri e i Coleotteri, in cui un solco longitudinale della piastra germinativa dà origine ad un tubo che, per processi morfogenetici noti, forma successivamente un doppio strato o foglietto interno (mesoderma o entomesoderma). In un secondo tipo (alcuni Lepidotteri e Imenotteri) le cellule della parte mediana della stria germinativa danno origine, con o senza costituzione di un solco gastrulare, ad uno strato interno che si separa dalle piastre laterali le quali finiscono per ricoprirlo. In altri casi (esempi tra gli artropodi primitivi e tra gli ortotteri) la gastrulazione non è generalmente accompagnata dalla formazione di un solco. Lo strato interno si forma per migrazione cellulare multipolare al disotto di tutto il blastoderma oppure per migrazione diffusa nella sola piastra germinativa.

Esempi di gastrulazione multipolare li troviamo tra gli apterigoti (Collemboli), tra i Miriapodi (*Scolopendra*, *Polydesmus*), di migrazione diffusa in ordini di pterigoti considerati più primitivi (*Gryllotalpa*, *Eutermes*, *Phyllodromia*). Abbiamo già visto l'interpretazione del fenomeno gastrulare dato da coloro che considerano i vitellofagi come entoderma.

Altri autori considerano la gastrulazione suddivisa in diverse fasi: HIRSCHLER (1924) sostiene la teoria bifasica per cui la prima fase sarebbe rappresentata dal processo di migrazione di cellule del blastoderma verso l'interno, la seconda invece dalla formazione di un solco gastrulare nella piastra germinativa. L'entoderma primario sarebbe costituito dalle cellule vitelline, l'entoderma secondario da due ammassi bipolari con o senza cordone mediano.

ROONWAL (1936) sostiene la teoria della gastrulazione multifasica. Le cellule

vitelline sono considerate un entoderma (primario quello rappresentato dalle cellule vitelline primarie, secondario dalle rimanenti). La prima fase della gastrulazione è rappresentata dalla separazione intravitellina dell'entoderma primario, la seconda fase da un primo solco ventrale, la terza da un secondo solco ventrale e dalla formazione dello strato interno ed infine una quarta fase dalla formazione dell'entoderma secondario.

La formazione dello strato interno.

Nell'*Haploembia solieri* e negli altri Embiotteri esaminati, la piastra germinativa, posta superficialmente nella faccia ventrale della metà posteriore dell'uovo (Fig. 1) è costituita inizialmente, come abbiamo visto, da un epitelio irregolarmente monostratificato, derivato dal blastoderma.

Se noi ora seguiamo, passo a passo, lo sviluppo successivo della piastra, notiamo innanzitutto la formazione delle tre pieghe sieroso-amniotiche che si formano molto precocemente, quando ancora nessun accenno alla formazione degli abbozzi delle appendici è ancora in atto (Figg. 1 e 2).

Mentre però sta avvenendo detto processo e mentre, contemporaneamente, la piastra si allunga caudalmente raggiungendo e superando il polo inferiore dell'uovo (Figg. 3 e 4) si assiste alla migrazione diffusa di cellule che, dalla loro posizione originaria nella piastra, migrano verso l'interno andando a costituire, dapprima irregolarmente ma poi in maniera sempre più definita, uno *strato interno*, giustapposto al primo da cui si sono originate. (Figg. 11 e 12). Questo strato o foglietto interno (*inner layer*, *unteres Blatt*) viene gradualmente a costituirsi su tutta la superficie interna della piastra germinativa.

Il foglietto interno si forma quindi per immigrazione diffusa ed uniforme di cellule da tutta la superficie della piastra germinativa.

La migrazione cellulare prosegue fino a che lo strato interno assume la struttura di un epitelio irregolarmente monostratificato, simile a quello esterno.

Appena costituiti i due strati, ha inizio la formazione dei sacchetti celomatici e gli abbozzi degli arti, di cui parleremo in altro capitolo.

Manca in Haploembia qualsiasi accenno alla formazione di un solco gastrulare.

Lo strato interno, formatosi per migrazione diffusa, si avvicina, per il modo di costituirsi, a quanto hanno descritto HAMMERSCHMIDT per *Carausius morosus* HEYMONS e NUSBAUM per *Phyllodromia germanica*, KOROTNEFF, HEYMONS e NUSBAUM per *Gryllotalpa*, e KNOWER per *Eutermes*. Tale modo sarebbe caratteristico dei pterigoti inferiori.

BUTT e JOHANSEN (1941) attribuiscono però scarso significato filetico al modo di formazione dello strato interno in quanto le diverse modalità si possono ritrovare non solo in specie sistematicamente vicine ma addirittura in tratti diversi di uno stesso embrione. Anche il solco gastrulare, secondo gli stessi autori, sa-

rebbe puramente un adattamento ontogenetico che può essere presente o assente in forme strettamente imparentate.

Che valore dobbiamo assegnare allo strato interno? Equivale esso al mesoderma o dobbiamo attribuirgli il significato di un entomesoderma?

Per rispondere a questa domanda, è necessario che venga chiarita la partecipazione di questo foglietto alla formazione dell'epitelio mesenterico. Se potremo

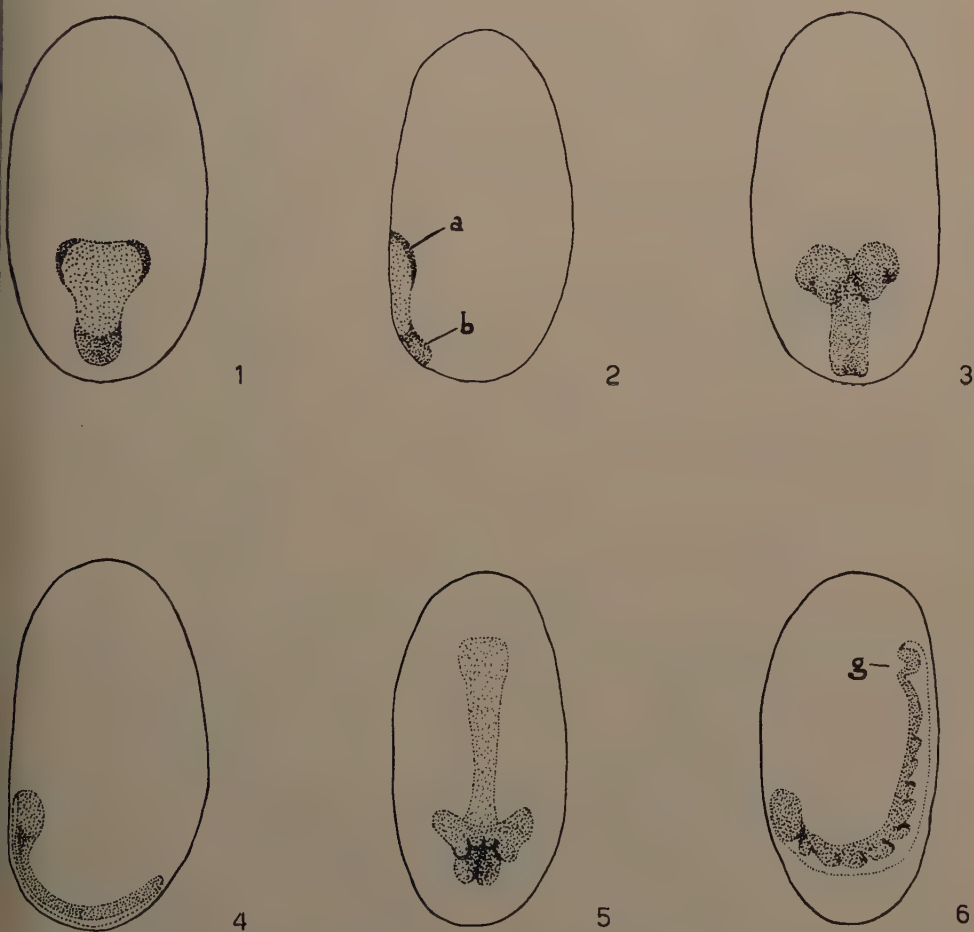


Fig. 1. — Uovo di *Haploembia solieri* al 6° giorno di incubazione. Piastra germinativa con inizio della formazione dell'amnios.

Fig. 2. — Lo stesso visto di lato. *a*: una piega sieroso-amniotica anteriore; *b*: piega sieroso-amniotica posteriore.

Fig. 3. — Uovo all'8° giorno. Nell'embrione si notano i lobi procefalici ed il protocormo

Fig. 4. — Lo stesso, visto di lato.

Fig. 5. — Uovo al 9° giorno. Embrione visto di fronte.

Fig. 6. — Uovo al 10° giorno visto di lato. Sono già abbozzate le appendici gnatali, quelle toraciche e le prime tre paia addominali. *g*: fossetta genitale.

stabilire che, negli stadi successivi, l'epitelio definitivo mesenterico deriva dalla proliferazione di due abbozzi bipolari entomesodermici, come avviene per esempio nell'ape, allora indubbiamente dovremo attribuirgli un valore di entomesoderma. In caso contrario si tratterà di uno strato puramente mesodermico.

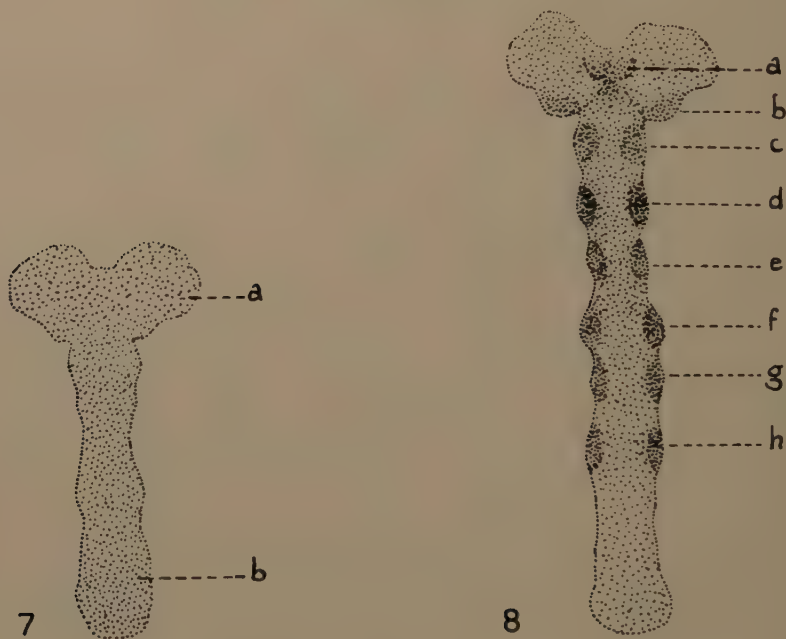


Fig. 7. — Embrione al 7° giorno, disteso e visto di fronte. *a*: protocefalo; *b*: protocormo.

Fig. 8. — Embrione al 9° giorno, disteso e visto di fronte. *a*: labrum; *b*: antenne; *c*: mandibole; *d*: mascelle I; *e*: labium; *f*, *g*, *h*: I, II e III paio di arti toracici.

Innanzitutto vediamo come si comporta lo strato interno in corrispondenza delle invaginazioni stomodeale e proctodeale, al loro primo apparire.

La fig. 13 rappresenta l'invaginazione stomodeale in uno stadio precoce della sua formazione. Vi notiamo, al disotto dell'ectoderma, un sottile strato interno, di natura mesodermica, che riveste uniformemente l'invaginazione stessa. Negli stadi successivi non si nota alcuna particolare formazione interessante il mesoderma cefalico o caudale, che possa assomigliare a quanto descrisse GRASSI nell'ape. In questa specie, come è noto, il mesoderma si costituisce non per migrazione diffusa, come negli Embiotteri, ma per separazione di una piastra mediana da due tratti laterali (piastre laterali) in corrispondenza di due solchi ventrali, paralleli, e successivo ricoprimento della piastra mediana dai lembi delle piastre laterali che finiscono per saldarsi insieme. All'estremità anteriore e po-

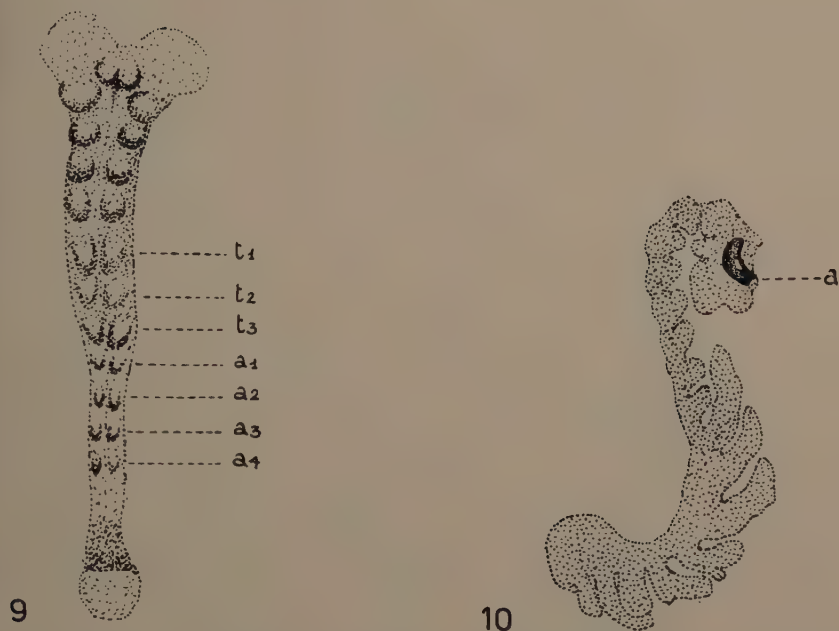


Fig. 9. — Embrione all'11° giorno, visto di fronte. t_1 , t_2 , t_3 : arti toracici; a_1 , a_2 , a_3 , a_4 : pleuropodi.
 Fig. 10. — Embrione al 13° giorno visto di lato, nella sua posizione naturale. a : introflessione proctodeale.



Fig. 11. — Sezione trasversale della piastra germinativa al 6° giorno mentre è in formazione o strato interno. a : piega sieroso-amniotica inferiore; b : strato esterno (ectodermico); c : strato interno (mesodermico); d : paraciti; e : vitellofagi.

teriore, la formazione del mesoderma avviene in altro modo. Quivi si formano carico della piastra mediana due ammassi cellulari che rappresentano gli abbozzi bipolari dell'entoderma. Essi, estendendosi dorsalmente e delaminandosi,

costituiranno, per fusione, un'unica coppa dorsale che formerà successivamente l'epitelio del tubo mesenterico, avvolgendo il tuorlo (*tegola* di GRASSI).

Ora, abbozzi entomesodermici e una coppa dorsale entodermica sono formazioni *assolutamente* assenti negli Embiotteri.

Ho esaminato con la massima cura lo sviluppo del foglietto interno soprattutto nel tratto cefalico e caudale ed ho constatato come la sua costituzione sia omogenea



Fig. 12. — Sezione longitudinale mediana della piastra nello stesso stadio della fig. precedente. Le stesse indicazioni.

genea su tutta la parete interna della originaria piastra germinativa. A mano a mano che si vengono a formare gli abbozzi degli arti, il foglietto mesodermico si segmenta, dapprima nei tratti pretoracico e toracico, successivamente in quello addominale, per dare quindi inizio ai primi abbozzi dei sacchetti celomatici.

Nei tratti stomodeale e proctodeale, allorquando le invaginazioni ectodermiche si approfondano, il rivestimento mesodermico finisce per assottigliarsi e scindersi in corrispondenza del fondo cieco dell'invaginazione, per cui in questo tratto non rimane che lo strato ectodermico. Molto precocemente, rispetto ad altri insetti, il fondo cieco si apre. Abbiamo così una condizione duratura che si

anterrà fino alla costituzione del mesentero definitivo e che è rappresentata da un *canale* (stomodeale e proctodeale) costituito da uno strato ectodermico vestito da un manicotto di cellule mesodermiche (Fig. 14 e 15). Una sottilissima lamina anista (*Grenzlamelle* di HEYMONS) all'imboccatura del canale impedisce, almeno in un primo periodo, che il tuorlo defluisca nel lume del canale stesso. Tale membranella scompare al 25° giorno.

Prima di esaminare la costituzione dell'intestino medio definitivo, è necessario passare in breve rassegna i fenomeni della segmentazione dell'embrione e la costituzione degli invogli provvisori del tuorlo.

La segmentazione dell'embrione e la formazione del mesoderma splancnico.

La segmentazione superficiale della piastra germinativa ha inizio immediatamente dopo la formazione del foglietto mesodermico. La Fig. 7 rappresenta la piastra distesa al 7° giorno, in visione frontale. Vi possiamo distinguere, secondo la classica denominazione di GRABER, una parte anteriore o cefalica (*Protocefalo*) comprendente due ampi lobi procefalici ed una posteriore, allungata ed uniforme (*Protocormo*) che darà origine ai segmenti gnatali, toracici ed addominali.

Sebbene non si abbia una netta segmentazione primaria del protocormo in divisioni maggiori (macromeri di AYERS) come è stato descritto per *Oecanthus*, tuttavia si riesce a distinguere morfologicamente un macrosomite addominale costituito dalla parte terminale del protocormo, la cui delimitazione con la regione toracica è indicata da una costrizione laterale. È invece completamente indistinguibile in questo stadio un gnatocefalo.

In una fase immediatamente successiva (Fig. 8) il protocormo si allunga considerevolmente portandosi sul lato dorsale dell'uovo e raggiungendo quindi con la estremità posteriore, il terzo anteriore dello stesso (Fig. 6).

Ha inizio ora (Fig. 8) la formazione dei primi abbozzi delle appendici articolari in forma dapprima di semplici addensamenti cellulari. Il manifestarsi di tali abbozzi è contemporaneo al formarsi dell'invaginazione stomodeale e proctodeale.

Distinguiamo quindi ventralmente ed esternamente, procedendo dalla parte cefalica a quella caudale: l'abbozzo pari del *labrum*, al disotto del quale è celata la invaginazione stomodeale, gli abbozzi delle antenne, delle mandibole, del primo paio di mascelle e del secondo paio (*labium*), quindi le tre paia di abbozzi degli arti toracici. Nel tratto corrispondente al macrosomite addominale va ora accennandosi gradualmente, a cominciare dal primo segmento ed interessando via via i successivi, la divisione microsomatica che si manifesta con la comparsa di abbozzi di appendici addominali per un totale complessivo di 11 paia. È interessante notare a questo riguardo come anche negli Embiotteri gli uriti, privi di arti nell'insetto adulto, presentino, in questo precocé stadio embrionale, degli abbozzi ben distinti di appendici (*pleuropodi* di WHEELER) di forma e costitu-

zione simile a quelli toracici ma di mole ridotta. Nello stadio rappresentato dalla fig. 9 sono già comparse le prime quattro paia. Le altre compaiono negli stadi immediatamente successivi. Esaminato l'embrione di fianco (Fig. 10) si osserva in corrispondenza del 7° segmento addominale, un incurvamento ad U dell'ultimo tratto addominale comprendente l'8°, il 9°, il 10° e l'11° segmento. L'estremità corrisponde ad un 12° segmento comprendente l'invaginazione proctodeale (indicata con « a » nella fig. 10).

Riguardo alla presenza di appendici embrionali fugaci, altri autori, come è noto, hanno riconfermato tale reperto in vari insetti (KOWALEWSKY in *Hydrophilus*, GRABER in *Mantis*, CHOŁODKOWSKY in *Periplaneta*, ecc.).

Riguardo invece al numero dei segmenti addominali nell'embrione, ricordiamo come 12 segmenti addominali siano stati riscontrati tra gli apterigoti e pterigoti primitivi, l'ultimo portando l'apertura anale (*Analsegment* di HEYMONS) privo di appendici e di cavità celomatiche (*Lepisma*, *Gryllotalpa*, *Eutermess*).

Alla segmentazione dello strato ectodermico segue di pari passo quella del mesoderma. I sacchetti celomatici, man mano che si formano, presentano il tipico aspetto cuneiforme. Quelli toracici ed addominali esibiscono ben presto tre diverticoli, poco sviluppati, uno dorso-rostrale, uno dorso-anale ed uno ventrale. Medialmente, le espansioni dei due sacchetti di uno stesso segmento si estendono e fondendosi insieme danno origine al mesoderma splancnico che, successivamente separerà il seno epineurale dal tuorlo (Fig. 20). Subito dopo la blastocinesi quando l'embrione ha assunto la sua posizione definitiva, il mesoderma splancnico si espande ai lati del corpo in concomitanza con l'accrescimento dorsale delle creste ectodermiche laterali. Alla fine di tale processo il tuorlo appare avvolto da un tubo cilindrico costituito appunto dalla lamina mesodermica viscerale che si continua anteriormente e posteriormente con lo strato mesodermico peristomodeale e periproctodeale. Questa è la condizione dell'intestino medio prima che abbia inizio la formazione dell'epitelio mesenterico.

La formazione dell'epitelio mesenterico.

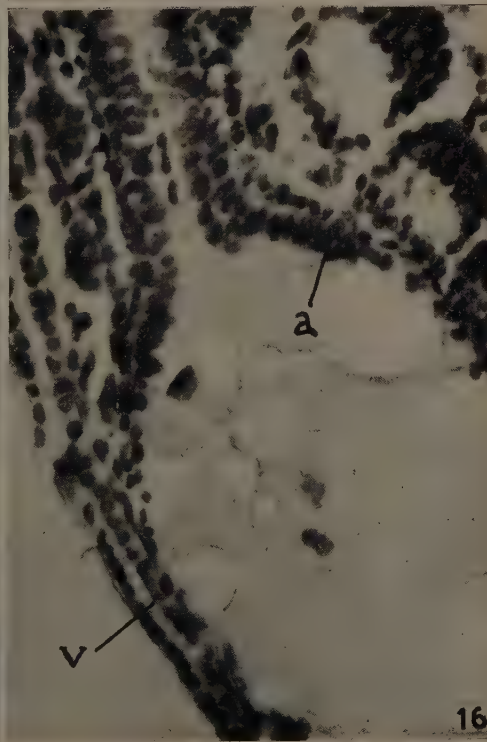
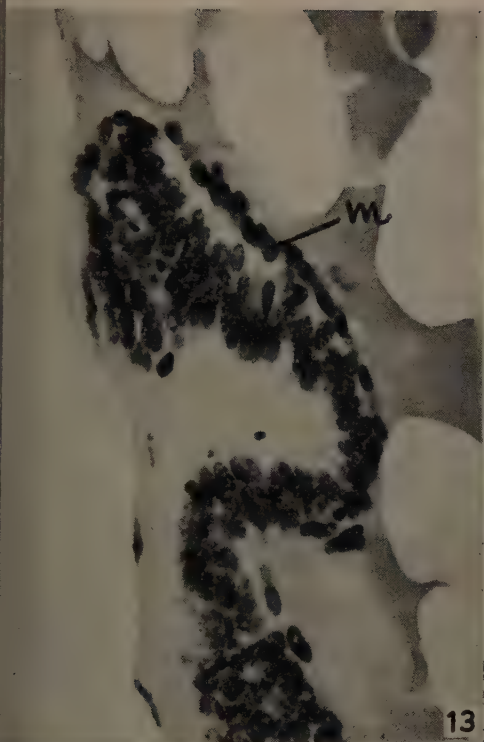
Subito dopo la blastocinesi, le pareti ectodermiche delle introflessioni stomodeale e proctodeale si presentano costituite da cellule straordinariamente stipate l'una accanto all'altra, come appare dalle figg. 14, 15, 19.

Fig. 13. — L'invaginazione stomodeale al 7° giorno in sezione longitudinale mediana. Al disotto dell'ectoderma è visibile un sottile ed uniforme strato mesodermico (m).

Fig. 14. — Sezione sagittale mediana di embrione al 20° giorno immediatamente dopo la blastocinesi. La figura rappresenta il polo inferiore dell'uovo con il fondo aperto dell'introflessione proctodeale. a: ectoderma; b: mesoderma; c: amnios.

Fig. 15. — Embrione di 22 g. Sezione sagittale mediana. Fondo dell'introflessione proctodeale. a: prima espansione ectodermica.

Fig. 16. — Embrione al 26° giorno. Sez. sagittale mediana. Estremità posteriore del mesentero. a: espansioni proctodeali. v: pareti del vaso dorsale.



Il manicotto mesodermico presenta anch'esso cellule addensate nel periodo preblastocinetico quando la lamina splancnica non si era ancora chiusa dorsalmente al tuorlo. Dopo tale chiusura, che determina una distensione della membrana splancnica, le pareti mesodermiche dei canali stomo- e proctodeale sono più distese e più sottili, come appare nella fig. 19.

Ha quindi inizio la formazione dell'epitelio mesenterico.

Nella fig. 15 che rappresenta il proctodeo al 22° giorno, si nota appunto una fase precocissima di tale processo. Esso risulterà essere più imponente all'estremità proctodeale del mesentero anzichè in quella stomodeale, per quanto anche qui presente. Le cellule ectodermiche, assiegate e stipate una vicino all'altra nella parete del canale, si estendono, per un processo di epibolia o scorrimento, al di sopra della lamina splancnica del mesoderma (Figg. 15, 16, 17, 18 e 19). Man mano che le pareti mesenteriche primitive vengono invase dall'ectoderma, nei canali stomodeale e proctodeale si assiste ad un assottigliamento, ad una riduzione di spessore delle pareti, in conseguenza del fenomeno descritto. È importante notare che durante tutto questo processo, non si notano assolutamente mitosi nelle cellule ectodermiche interessate, nè stomodeali nè proctodeali. Non si tratta quindi, almeno nel caso degli Embiotteri, di una *proliferazione cellulare*, come è stato sostenuto da HEYMONS, da ROONWAL e da altri autori, ma di un semplice fenomeno di *epibolia*, dimostrato dalla progressiva distensione e conseguente assottigliamento delle pareti ectodermiche dei canali stomo-proctodeali, dalla assenza di divisioni cellulari (le quali sono la condizione fondamentale delle proliferazioni cellulari) ed infine dalla visibile, progressiva posizione delle cellule ectodermiche sulla parete splancnica sottostante, fino alla congiunzione dei lembi invasivi anteriore e posteriore verso la zona mediana dell'intestino medio.

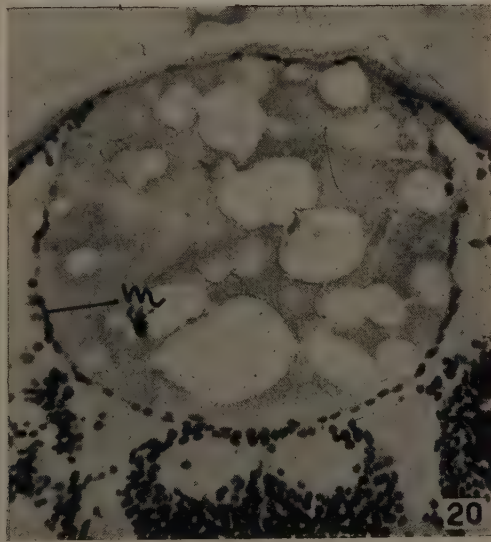
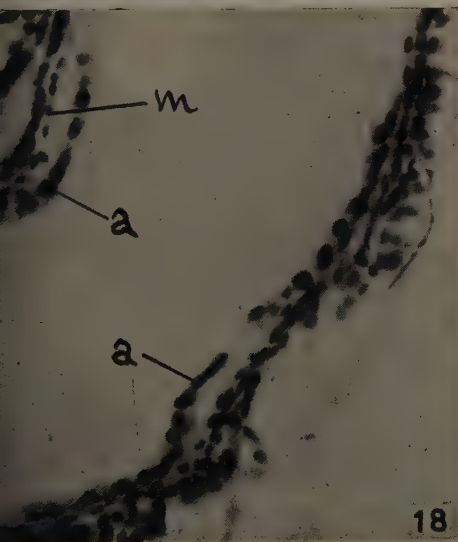
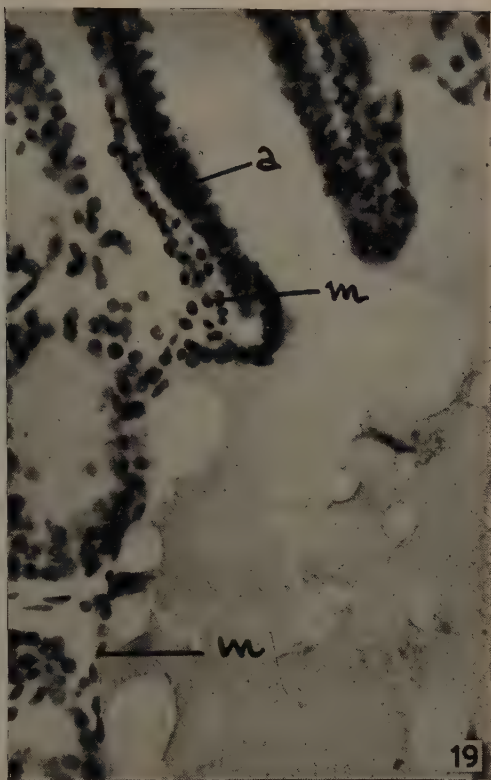
Che non si tratti di derivazione mesodermica o entodermica dell'epitelio mesenterico lo si nota bene dalla Fig. 19 che rappresenta l'estremità stomodeale proprio all'inizio del processo di epibolia. Lo strato ectodermico (*a*) è di notevole spessore. Al disotto dell'ectoderma notiamo uno strato mesodermico (*m*), assai più debole, a cellule rade e poco numerose, che si continua con la lamina splancnica (indicata pure con « *m* »). Non esistono abbozzi di entoderma presuntivo nè in questo tratto nè in quello proctodeale, all'infuori di questo strato mesodermico che, come è noto, darà la muscolatura sia dell'intestino anteriore e posteriore sia di quello medio.

Fig. 17. — Embrione al 27° giorno. Sezione sagittale spostata un po' lateralmente. *a*: epitelio ectodermico del mesentero. *m*: strato mesodermico sottostante.

Fig. 18. — Embrione al 27° giorno. Sezione sagittale. Particolare delle pareti mesenteriche (terzo posteriore dell'intestino medio). *a*: epitelio ectodermico; *m*: strato mesodermico.

Fig. 19. — Embrione al 25° giorno. Sezione sagittale mediana. Stomodeo. *a*: parete ectodermica; *m*: strato mesodermico.

Fig. 20. — Embrione al 21° giorno. Sezione trasversa in corrispondenza del primo segmento addominale. *m*: lamina splancnica.



Una ulteriore controprova della derivazione ectodermica stomo-proctodeale dell'epitelio mesenterico è data dalla colorazione dei nuclei di tali cellule ectodermiche e del loro aspetto morfologico. I nuclei si colorano, alla doppia colorazione Ematossilina Carazzi-Feulgen, con una tinta violetta molto intensa che tende al rosso mentre le cellule splancniche sottostanti presentano i nuclei blu. Ancora i nuclei delle cellule ectodermiche scorrenti sono sferici o subsferici, quelli mesodermici della lamina sottostante allungati o affusolati. (Figg. 19 e 25).

In conclusione:

Non vi è alcun dubbio sulla origine *ectodermica* dell'epitelio mesenterico. Esso deriva dalle pareti ectodermiche dei canali stomodeale e proctodeale e avviene, almeno negli Embiotteri, per un processo di *epibolia* o *scorrimento cellulare* sulla lamina splancnica.

Nel mio materiale non si può parlare di *proliferazione cellulare* non essendo ci divisioni cellulari in atto.

Il processo è più imponente nel tratto proctodeale per cui la parete della metà posteriore del mesentero risulta più ricca di cellule ectodermiche. È meno intenso nel tratto anteriore mesenterico ove le cellule ectodermiche sono più rare.

In base a questi fatti siamo ora in grado di affermare che il foglietto interno (*inner layer*) è da considerarsi un foglietto *mesodermico*.

La partecipazione delle cellule vitelline alla formazione della parete mesenterica

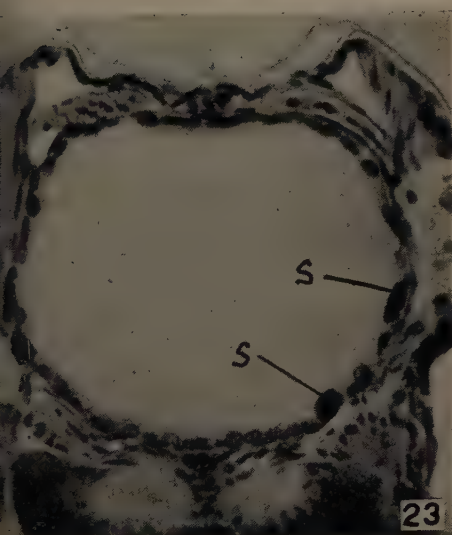
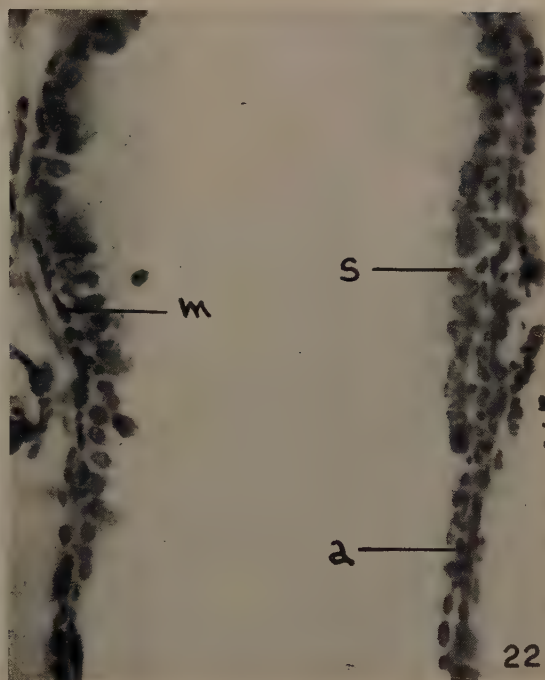
A mano a mano che si completa il processo di scorrimento delle cellule ectodermiche con il loro assestamento sulla lamina splancnica, si assiste ad una migrazione delle cellule vitelline verso le pareti intestinali, ad un loro assieppamento sulle pareti stesse, e quindi ad una loro localizzazione tra le cellule epiteliali di origine ectodermica a formare un'assisa cellulare mista (Figg. 22 e 25). Poche sono le cellule vitelline che, escluse da tale migrazione, rimangono immerse nelle parti centrali del tuorlo. Questi vitellofagi andranno incontro a picnosi nucleare (Fig. 26) e verranno riassorbiti. Non sono riuscito a stabilire se tali vitellofagi si differenzino da quelli migranti e se essi possano forse corrispondere alle cellule vitelline primarie, essendo le migranti forse le cellule vitelline secondarie.

Fig. 21. — Embrione al 34° giorno. Sezione sagittale mediana. Mesentero. S: parte anteriore in cui avviene l'accumulo dei vitellofagi sulla parete, come si nota nella figura.

Fig. 22. — Embrione di 34 giorni. Particolare delle pareti mesenteriche nel tratto anteriore-mediano. m: muscolatura; s: vitellofagi; a: epitelio ectodermico.

Fig. 23. — Embrione di 34 giorni. Sezione trasversa del tratto posteriore del mesentero, con la parete di origine ectodermica quasi esclusiva. s: vitellofagi.

Fig. 24. — Embrione di 34 giorni. Sezione trasversa del tratto anteriore del mesentero con la parete di origine prevalentemente vitellina. Si nota l'assieppamento dei vitellofagi.



in quanto, come dissi a suo tempo, nessun carattere morfologico permette di distinguere le due categorie.

Nell'analisi dei processi citologici che ora intraprendo, mi limiterò all'esame dei soli nuclei, in quanto lo studio del citoplasma non è perseguibile con i coloranti da me usati e deve essere compiuto con tecniche più appropriate.

Abbiamo visto a suo tempo come i nuclei dei vitellofagi si presentino molto grandi, polimorfi, spesso variamente lobati. Io li ho considerati poliploidi in base al numero dei nucleoli ed in base ai fenomeni cromatinici avvenuti all'epoca del loro differenziamento precoce. Ho ammesso che la loro poliploidia non è di grado elevato (tetra- o esaploidia). Dopo il loro differenziamento non si nota più a loro carico alcun processo di divisione mitotica. Essi permangono nel tuorlo in numero e forma costanti fino al momento in cui, formatosi l'epitelio mesenterico, come abbiamo visto, avviene la loro migrazione simultanea, ma non totale, verso le pareti dell'intestino medio.

Ora, questa migrazione non è uniforme per tutti i tratti del mesentero. Nel quarto anteriore vi è un accumulo assai più intenso di vitellofagi tanto da far apparire la parete di questo tratto assai più spessa che nella parte posteriore (Figg. 21 e 22). Nei tre quarti posteriori, invece, noi troviamo sì cellule vitelline alla parete ma distribuite qua e là, in modo disperso, tra le cellule epiteliali di provenienza ectodermica. La fig. 23 rappresenta appunto in sezione trasversale l'intestino medio nel tratto posteriore. Vi si osservano due vitellofagi sulla parete, per il resto, tappezzata di cellule epiteliali di origine proctodeale. La fig. 24 mostra invece l'intestino medio sezionato trasversalmente nel quarto cefalico. Le cellule vitelline sono assiegate in gran numero sulle pareti e vi si stanno svolgendo i processi cariologici che ora verranno descritti.

I preparati per sezione ci dicono ben poco a questo riguardo. La fig. 25, che ci rappresenta a forte ingrandimento la parete mesenterica, ci permette soltanto di distinguere, oltre ai nuclei appiattiti (*m*) delle cellule mesodermiche, i nuclei delle cellule epiteliali di origine stomodeale (segnati con *a*) e quelli delle cellule vitelline (segnati con *S, S₁*), disposti questi ultimi allo stesso livello delle precedenti.

Se invece preleviamo il mesentero di un embrione in questo stadio e lo esaminiamo con la tecnica dello schiacciamento, noi osserviamo con la massima chiarezza che i grossi nuclei dei vitellofagi vanno incontro, in questo momento e in questa sede, ad una o più divisioni amitotiche, come dimostrano le figg. 27 e 28.

Tali divisioni si compiono per semplice strozzamento mediano del nucleo. A volte, allo strozzamento segue un breve peduncolo che indica l'ultimo tratto di collegamento dei due nuclei figli fra loro; a volte la loro scissione avviene in corrispondenza di un tratto più ampio della superficie nucleare.

A carico della cromatina nucleare non si nota alcun particolare cambiamento dall'aspetto che i nuclei presentavano precedentemente.

Dall'esame comparativo si ha modo di arguire che i grossi nuclei si dividono per una o due volte consecutive finchè vengono raggiunte le dimensioni ridotte dei nuclei figli i quali, distribuiti in assisa regolare insieme alle cellule epiteliali di origine ectodermica, formano un epitelio misto.

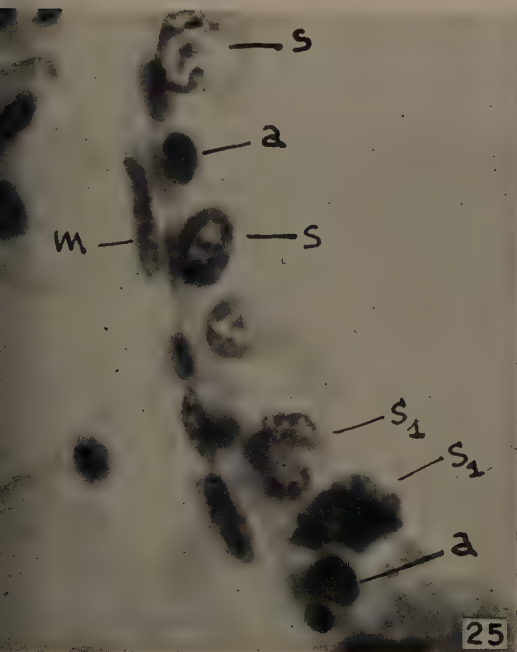


fig. 25. — Embrione di 34 giorni. Sezione longitudinale. Particolare della parete mesenterica del tratto anteriore. *m*: nuclei di cellule muscolari, *s*: nuclei figli dei vitellofagi, ordinati sulla parete; *s*₁: vitellofagi ancora non divisi; *a*: nuclei di cellule epiteliali di origine stomodermica.



fig. 26. — Larva neonata (37° giorno). Sezione sagittale. Il mesentero contiene diversi vitellofagi in picnosi nucleare (*s*).

Il processo ha luogo durante gli ultimi giorni della vita embrionale e si continua, dopo la schiusa, per un tempo successivo, che non sono ancora in grado di precisare.

Analogo processo subiscono i vitellofagi distribuiti lungo le pareti del tratto posteriore del mesentero.

Discussione.

Il problema della partecipazione delle cellule vitelline alla composizione dell'epitelio mesenterico non è però risolto.

Abbiamo detto che, al momento della nascita e subito dopo, il processo non è ancora ultimato ed esiste ancora abbondante tuorlo nel mesentero nel quale si trovano i nuclei picnotici di quei vitellofagi che non sono migrati alla parete (Fig. 26).

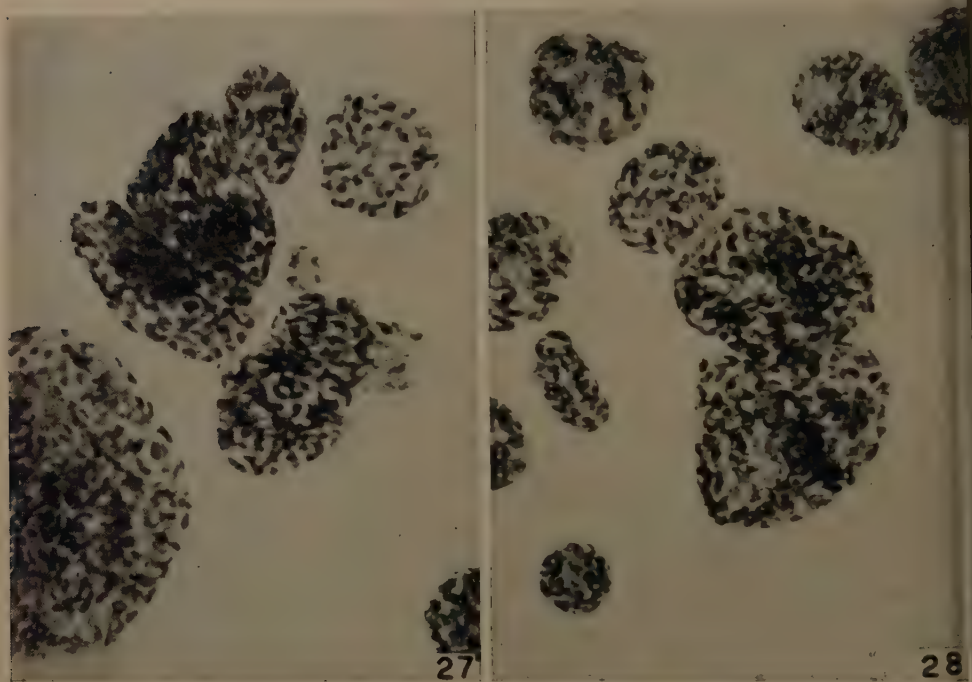


Fig. 27. — Nuclei di vitellofagi della parete mesenterica in divisione amitotica. (Da embrione di 34 giorni). (Schiacciamento).

Fig. 28. — Nuclei di vitellofagi della parete mesenterica di cui uno in divisione amitotica. (Da embrione di 34 giorni). (Schiacciamento).

Ma qual'è il comportamento dell'epitelio mesenterico così formato dopo che tutto il tuorlo è stato digerito e dopo che la larva ha iniziato a cibarsi?

È la struttura istologica descritta or ora *definitiva* oppure essa si mantiene tale fintantochè rimane ancora del tuorlo nel lume intestinale, e si modifica invece con l'entrata del cibo?

Purtroppo a queste domande non sono in grado di rispondere in quanto il mio materiale si esaurisce con le larvette neonate ancora digiune.

Questo inconveniente si è presentato ad altri studiosi dell'embriologia degli insetti, da quanto si nota nella letteratura. Così TSCHUPROFF negli Odonati, STUART in *Melanoplus differentialis*, GRANDORI in *Bombix* non completano nella stessa maniera le loro ricerche.

Per quanto mi consta, BUTT (1941) è l'unico autore il quale ha proseguito lo studio sullo stesso materiale della TSCHUPROFF ed ha potuto stabilire che il tratto centrale del mesentero, il quale al momento della nascita, era occupato esclusivamente da cellule vitelline, viene successivamente e gradualmente sostituito da epitelio di origine ectodermica, durante tutto il primo stadio larvale dell'insetto, assumendo il suo aspetto definitivo appena al momento della prima muta.

La questione resta quindi « *sub judice* » per gli Embiotteri ed io la riprenderò in un prossimo lavoro riguardante la modificazione che subisce l'epitelio mesenterico nel passaggio della larva alla dieta normale.

È interessante notare la grande assomiglianza dei mie reperti con quelli dello STUART in *Melanoplus differentialis*. Anche in questa specie si ha migrazione di cellule vitelline verso la parete mesenterica ove viene formato uno strato avventizio nel quale ogni nucleo vitellino si divide più volte amitoticamente formando una dozzina di nuclei più piccoli i quali vengono considerati dall'autore gli unici componenti dell'epitelio mesenterico definitivo. Ma anche lo STUART ha interrotto le sue ricerche a larvette di un giorno dalla schiusa senza indagare stadi successivi.

Il processo amitotico involve questioni di carattere generale, come quella della entità del corredo cromosomico nelle cellule così originate, quella della loro futura funzionalità e ancora della loro futura riproduzione, posto che esse prendano realmente parte definitiva alla costituzione dell'epitelio mesenterico.

Circa il loro destino, in questa sede possiamo fare delle vaghe supposizioni. Da una parte il carattere tipico della riproduzione amitotica deporrebbe a favore di una fine imminente di questi elementi differenziatisi fin dall'inizio della vita embrionale e deputati ad una funzione che è quella, universalmente riconosciuta, di contribuire alla dissoluzione del tuorlo utilizzato dall'embrione, funzione specifica quindi che dovrebbe cessare con l'esaurimento del tuorlo stesso.

D'altra parte la disposizione di queste cellule in un epitelio che si arricchisce addirittura di un *rabdorio* al momento della nascita (Fig. 26), e più, il loro accumulo in quel tratto parietale anteriore dove proprio la percentuale delle cellule epiteliali ectodermiche è ridotta, quasi per dar modo di localizzarsi ai nuovi elementi immigrati, farebbe pensare ad un riordinamento definitivo rispondente a diverse prerogative funzionali della parete mesenterica. Quali, infatti, in tale parete, sono le cellule secernenti il succo gastrico e quali quelle deputate all'assorbimento? Negli Embiotteri tali funzionalità sono oscure, malgrado le ricerche del LACOMBE.

Il problema fisiologico potrebbe essere collegato a quello istogenetico dell'epitelio mesenterico soprattutto in rapporto alla diversa distribuzione topografica dei due tipi di cellule sulla parete ma attende ulteriori indagini cariolomiche ed istochimiche per essere risolto,

Dal punto di vista teorico, l'origine ectodermica dell'epitelio mesenterico rappresenta, indubbiamente, come per la prima volta ebbe a manifestare HEYMONS, una condizione di eccezione alla vecchia teoria dei foglietti germinali. L'intestino medio, almeno in alcuni gruppi di insetti, ha indubbiamente una origine secondaria mentre in altri deriva sicuramente da abbozzi entodermici ben distinti. Un errore commesso da molti autori è stato quello di generalizzare incautamente i risultati ottenuti su una o poche specie.

I reperti da me ottenuti in alcuni Embiotteri, di famiglie differenti, sembrano uniformi e costanti per quest'ordine.

Conclusioni più generali ed accostamenti comparativi saranno possibili solo quando sarà completamente chiarita la parte che i vitellofagi hanno nella formazione della parete definitiva del mesentero.

In conclusione:

L'epitelio mesenterico di *Haploembia solieri* e degli altri embiotteri studiati, è costituito, *al momento della schiusa*, da due componenti:

1. Da cellule di origine ectodermica derivate per scorrimento o epibolia dalle pareti dei canali stomodeale e proctodeale; quantitativamente più abbondanti nei tre quarti posteriori dell'intestino medio, meno abbondanti nel restante quarto anteriore.

2. Da cellule di origine vitellina i cui nuclei sono derivati, per amitosi, dai nuclei dei vitellofagi migrati alla periferia del mesentero.

La prima componente ha indubbiamente un carattere definitivo. La seconda potrebbe anche essere provvisoria e necessita di una analisi estesa agli stadii post-embrionali successivi.

Gli strati muscolari sottostanti non presentano alcuna particolarità, derivando dal mesoderma splanchnico.

Rimane ancora oscura, nella sua genesi, la natura dello strato connettivale primitivo intermedio il quale, nell'intestino definitivo degli Embiotteri, ha pure una certa consistenza (STEFANI 1960).

LA DETERMINAZIONE DELLA LINEA GERMINALE FEMMINILE

La presente ricerca sulla origine delle cellule germinali e sul loro comportamento negli stadi precoci dello sviluppo embrionale completa le notizie da me a suo tempo fornite (STEFANI 1956) sull'evoluzione ontogenetica dell'ovario dalla schiusa all'immagine oltre a quelle sui processi meiotici studiati e descritti in diversi lavori (STEFANI 1956, 1959), permettendo così di avere una visione più completa sul comportamento della linea germinale durante tutto il ciclo biologico.

Come è noto, la determinazione della linea germinale negli insetti, nel senso

ella prima differenziazione morfologica delle cellule germinali e quindi del loro precoce riconoscimento durante gli stadi dello sviluppo embrionale precedenti il loro insediamento definitivo negli abbozzi delle gonadi, è molto variabile da gruppo a gruppo.

Secondo il tentativo di classificazione del NELSEN, si hanno cinque modalità diverse:

Nei Ditteri, nei Sifonatteri, negli Imenotteri parassiti, in *Isotoma* ed in alcuni Coleotteri, le cellule germinali sono distinguibili assai precocemente durante le fasi della segmentazione dell'uovo o durante la formazione del blastoderma. Classici e ben noti sono i casi di *Miastor mestraloas*, *Phytophaga destructor*, di *Chironomus* ed altri ancora.

In un secondo gruppo comprendente, fra l'altro, i Dermatteri, alcuni Afidi, alcuni Coleotteri, le cellule germinali si evidenziano subito dopo la formazione del blastoderma.

In un terzo gruppo ancora (*Lepisma*, alcuni Omotteri e Lepidotteri) le cellule germinali sono riconoscibili dopo la formazione della stria germinativa ma prima che si formi lo strato interno.

In un quarto gruppo, NELSEN riunisce quegli insetti (*Gryllus*, *Periplaneta*, *Blattella*, *Melanoplus*, *Tenebrio*, *Tribolium*, *Pyrhrocoris*) nei quali le cellule germinali appaiono distinte durante la gastrulazione prima della formazione dei sacchetti celomatici.

Infine, in un quinto gruppo (*Bombyx*, *Hydrophilus*, *Apis*, *Locusta*) le cellule germinali appaiono appena dopo la formazione delle cavità celomatiche.

La prima comparsa delle cellule germinali nell'Haploembia.

Per questa ricerca mi sono servito esclusivamente di uova del biotipo partenogenetico di *Haploembia solieri* per cui quanto viene qui esposto riguarda esclusivamente il sesso femminile.

Ho discusso altrove (STEFANI 1959) l'assenza di un *oosoma* nell'uovo degli Embiotteri. Durante la segmentazione tutte le cellule sono morfologicamente uguali fra loro e non si nota alcuna particolare localizzazione di blastomeri che potrebbero venire interpretati come presuntive cellule germinali.

Più tardi, l'uniformità di costituzione della piastra germinale, nel suo primo apparire, non consente di distinguere in seno ad essa cellule morfologicamente differenziate, ma quando, con il formarsi del mesoderma e dei primi abbozzi delle appendici, l'embrione si allunga caudalmente raggiungendo con l'estremità caudale quasi il polo opercolare dell'uovo (Fig. 6), allora si mette in evidenza una concavità dell'ultimo tratto addominale rivolta verso l'interno, un ammasso di cellule ben distinto (indicate nella Fig. 6 con g). L'origine di tali cellule è indubbiamente *ectodermica* in quanto esse sono già distinte dal sottostante strato quando ancora il foglietto mesodermico è in via di formazione nel tratto caudale.

Le cellule si riconoscono nei preparati per una minor tingibilità nucleare, per una loro maggior grandezza. Si tratta di cellule a nucleo sferico con contorni ben marcati.

Ben presto, quando con la formazione dell'invaginazione proctodeale, l'em-

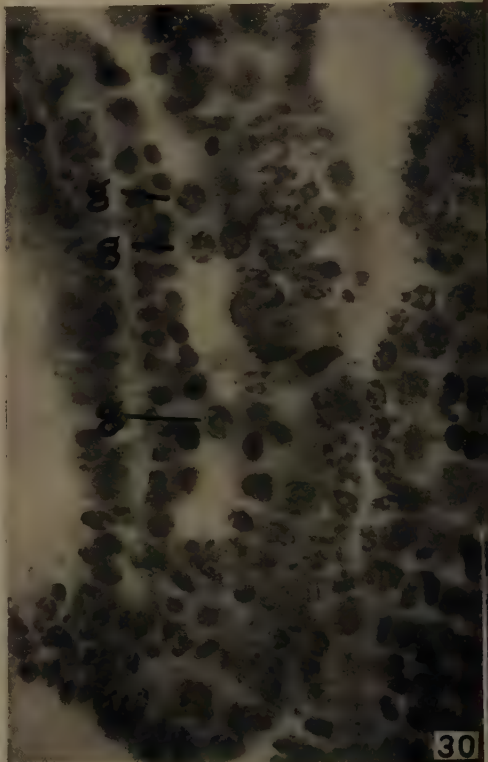


Fig. 29. — Sezione sagittale di embrione al 13° giorno. Parte addominale. g: cellule germinali presuntive.

Fig. 30. — Particolare del prep. precedente a maggiore ingrandimento. g: cellule germinali presuntive localizzate nella fessura derivata dalla fossetta germinale.

brione si piega ad U nel tratto addominale, come più sopra descritto, queste cellule, rimanendo al loro posto, vengono a trovarsi automaticamente in una fessura compresa tra i segmenti 8°, 9°, 10°, 11° ed il tratto proctodeale (segmento anale), fessura che è derivata direttamente dalla primitiva concavità sopradescritta (Figg. 29 e 30). Qui le cellule si possono trovare ancora per un certo tempo dopodichè non è più possibile seguirle.

HEYMONS ha descritto in *Gryllus* e *Periplaneta* una concavità simile a quella di *Haploembia*, denominandola *Geschlechtsgrube*. In tale fossetta genitale si

ifferenziano, secondo questo autore, le cellule germinali le quali, dopo la formazione dei sacchetti celomatici, migrano e passando tra il mesoderma ed il orlo vanno a localizzarsi nella cresta genitale mesodermica ove si costituiscono i abbozzi delle gonadi.

Oggi tale migrazione viene generalmente ammessa ed io, pur non avendo

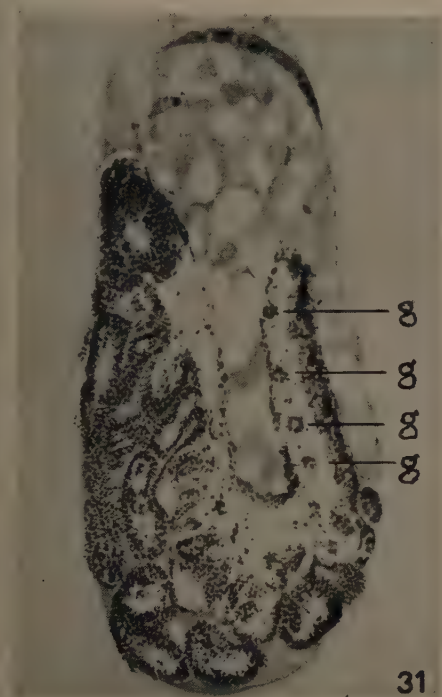


fig. 31. — Embrione durante la blastocinesi (20° giorno). g: quattro dei cinque abbozzi ovarici.

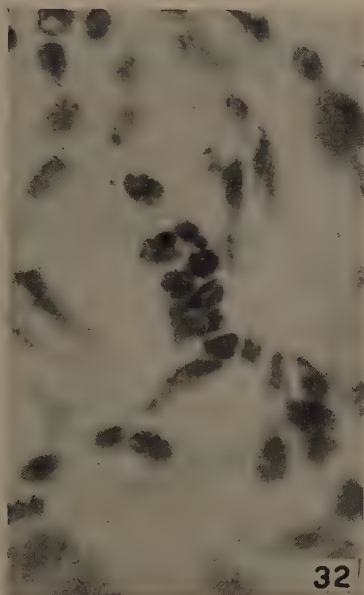


fig. 32. — Un abbozzo della gonade femminile al 22° giorno.

otuto seguirne il percorso, ammetto che esso avvenga e, per la corrispondenza dei particolari tra l'*Haploembia* e le altre specie anzidette, considero tali cellule come *cellule germinali presuntive*.

L'*Haploembia* apparterrebbe quindi al quarto gruppo della classificazione di Nelsen.

La formazione degli abbozzi ovarici.

La formazione delle gonadi femminili non offre particolarità degne di nota. Esse derivano dalla parete mediana delle cavità celomatiche. Al momento della

blastocinesi (Fig. 31) le cinque paia di « nidi » ovarici sono già ben distinguibili ed uno di essi è rappresentato, a forte ingrandimento, dalla fig. 32.

L'abbozzo o nido ovarico è fusiforme ed è costituito da un rivestimento di poche cellule mesodermiche nel cui interno si localizzano le cellule germinali. Dorsalmente e ventralmente i nidi sono collegati l'un l'altro da due cordoni cellulari. Quello dorsale si trasformerà in filamento terminale, quello ventrale in ovidotto.

Topograficamente gli abbozzi ovarici si formano nei primi 5 segmenti addominali, strettamente addossati al mesoderma splanchnico. Essi si manterranno inalterati per tutto il periodo successivo di vita embrionale e solo nella larva della prima età si evolveranno come è stato descritto altrove (STEFANI 1956 pag. 163-166).

BIBLIOGRAFIA

- BOUNOURE L., 1939. — *L'origine des cellules reproductrices et le problème de la lignée germinale*. Gauthier-Villars, Paris.
- BUTT F. H., 1941. — *cfr.* JOHANNSEN and BUTT 1941.
- DEEGENER P., 1900. — *Entwicklung der Mundwerkzeuge und des Darmkanals von Hydrophilus*. Zeit. Wiss. Zool., **68**: 113-168.
- DOHRN A., 1866. — *Zur Embryologie der Arthropoden*. Centr. Med. Wiss., **54**: 849-851.
- GRABER V., 1889. — *Vergleichende Studien über die Embryologie der Insecten und insbesondere der Musciden*. Denk. Kais. Akad. Wiss. Wien, **56**: 257-314.
- GRANDORI R., 1932. — *Lo sviluppo embrionale del baco da seta*. Mem. III. Boll. Labor. Zool. e Bach. Milano, **3**: 43-128.
- GRASSI B., 1885. — *Studi sugli Artropodi. Intorno allo sviluppo delle api nell'uovo*. Atti Acc. Gioenia, Catania, S. III, **18**: 145-222.
- HAMMERSCHMIDT J., 1910. — *Beiträge zur Entwicklung der Phasmatiden*. Zeit. Wiss. Zool., **95**: 221-242.
- HEIDER K., 1889. — *Die Embrionalentwicklung von Hydrophilus piceus*. G. Fischer, Jena.
- HENSON H., 1932. — *The development of the alimentary canal in Pieris brassicae and the endodermal origin of the Malpighian tubules in insects*. Quart. Journ. Micr. Sci., **75**: 283-309.
- HEYMONS R., 1895. — *Die Embrionalentwicklung von Dermapteren und Orthopteren unter besonderer Berücksichtigung der Keimblätterbildung*. G. Fischer, Jena.
- HIRSCHLER J., 1928. — *Embryogenese der Insekten*. In SCHRÖDER: *Handbuch der Entomologie*, **10**: 570-824, G. Fischer, Jena.
- HOFFMANN R. W., 1911. — *Zur Kenntnis der Entwicklungsgeschichte der Collembolen*. Zool. Anz., **37**: 353-377.
- , 1914. — *Die embryonalen Vorgänge bei den Strepsiteren und ihre Deutung*. Verh. a. Deut. Zool. Ges., **24**: 192-206.
- JOHANNSEN O. A. and BUTT F. H., 1941. — *Embryology of Insects and Myriapods*. Mc Graw-Hill, New York.
- KERSHAW J. C., 1914. — *Development of an Embiid*. Journ. Roy. Micr. Soc., **24**: 27.
- KNOWER H. M., 1900. — *The embryology of a termite*. Journ. Morph., **16**: 505-568.
- KOROTNEFF A., 1894. — *Zur Entwicklung des Mitteldarmes bei den Arthropoden*. Biol. Centr., **14**: 433-434.
- KOWALEWSKY A., 1886. — *Zur Embrionalentwicklung der Musciden*. Biol. Centr., **6**: 49-56.
- LECAILLON A., 1897. — *Contribution à l'étude des premiers phénomènes du développement*.

- embryonnaire chez les insectes particulièrement chez les coléoptères*. Arch. d'Anat. Micr., **1**: 205-224.
- UZINGER H., WIESMANN R. und LEHMANN F. E., 1926. — *Zur Kenntnis der Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Stabheuschrecke Carausius morosus*. G. Fischer, Jena.
- SKIEWICZ J. und POLUSZYNSKI G., 1927. — *Embryologische Untersuchungen an Strepsipteren. Embryogenesis der Gattung Stylops*. Bull. Intern. Acad. Sci. Cracovie, **3**: 1093-1226.
- SBAUM J. und FULINSKI B., 1906. — *Zur Entwicklungsgeschichte des Darmdrüsenblattes bei Gryllotalpa vulgaris*. Zeit. Wiss. Zool., **93**, 306-348.
- ILIPTSCHENKO J., 1912. — *Beiträge zur Kenntnis der Apterygoten. III. Die Embryonalentwicklung von Isotoma cinerea*. Zeit. Wiss. Zool., **103**: 519-660.
- CHARDAS A. G., 1932. — *Comments on the origin of the midgut in insects*. Journ. Morphology, **53**: 433-441.
- ONWAL M. L., 1936. — *Studies on the embryology of the African migratory locust, I. The early development, with a new theory of multiphased gastrulation among insects*. Phil. Trans. Roy. Soc. London, S.B., **226**: 391-421.
1937. — *Studies on the embryology of the African migratory locust, II. Organogeny*. Phil. Trans. Roy. Soc. London, S.B., **227**: 175-244.
- NDER K., 1956. — *On indian Insect Types. IV. The early Embryology of Pyrilla perpusilla*. Aligarh Muslim Univ. Publ., 1-61.
- EFANI R., 1956. — *Il problema della partenogenesi in Haploembia solieri Ramb.* Atti Acc. Naz. Lincei, Mem. V Sez., **3**: 127-201.
1959. — *I fenomeni cariologici nella segmentazione dell'uovo ed i loro rapporti con la partenogenesi rudimentale ed accidentale negli Embiotteri*. Caryologia, **12**: 1-70.
- UART R. R., 1935. — *The development of the mid-intestine in Melanoplus differentialis*. Journ. Morph., **58**: 419-438.
- CHOMIROFF A., 1879. — *Über die Entwicklungsgeschichte des Seidenwurms*. Zool. Anz., **2**: 64-67.
- YAMA K., 1902. — *Contributions to the study of silk-worms. 1. On the embryology of the silk-worm*. Bull. Coll. Agr. Tokyo Imp. Univ., **5**: 73-118.
- SCHUPROFF H., 1903. — *Über die Entwicklung der Keimblätter bei den Libellen*. Zool. Anz., **27**: 29-34.

SUMMARY

In *Haploembia solieri* and other investigated Embiids, the inner layer is wholly mesodermic and is formed by a diffuse migration of cells from the germ band. No gastral furrow is present nor entoderm rudiments are discernible. When the splanchnic mesoderm is formed, the mid-gut epithelium arises by a process of epiboly of the cells of the stomodaeal and proctodaeal walls which overgrowth the splanchnic mesoderm of the mid-gut.

The process is more intensive at the proctodaeum than at the stomodaeum. Later, the yolk cells, except some of them, migrate towards the periphery where their huge nuclei divide repeatedly by amitotic divisions and then place themselves among the cells of ectodermal origin. The majority of yolk cells are concentrated in the anterior part of the mid-gut.

The presumptive germ cells in *Haploembia solieri* arise from the ectoderm in a little abdominal groove at the time when the inner layer is formed.

The five rudiments of the gonads arise in the first five abdominal segments

RIASSUNTO

In *Haploembia solieri* e negli altri Embiotteri esaminati, il foglietto interno si forma per migrazione diffusa di cellule dalla piastra germinativa. È assente un solco gastrulare. Non si hanno abbozzi bipolari entodermici. Costituitosi il mesoderma splanchnico, l'epitelio mesenterico

si forma per un processo di epibolia, e non di proliferazione, delle cellule della parete ectodermica stomodeale e proctodeale; il processo è più intenso nel tratto mesenterico proctodeale che non in quello stomodeale. Successivamente le cellule vitelline, tranne alcune, migrano alla periferia assiepandosi sulle pareti. L'assiepamento è assai più intenso nel quarto anteriore dove le cellule epiteliali di origine stomodeale sono più rade. Sulla parete i nuclei dei vitellofoli subiscono ripetute divisioni amitotiche disponendosi quindi in un'assisa uniforme tra le precedenti cellule di origine ectodermica. Al momento della schiusa, l'epitelio mesenterico è quindi di costituzione mista e di derivazione prevalentemente ectodermica nei tre quarti posteriori e prevalentemente vitellina nel quarto anteriore del mesentero.

Per quanto riguarda la linea germinale, in *Haploembia solieri* si ha una fossetta all'estremità addominale dell'embrione nella quale si raccolgono, all'inizio della formazione del mesoderma, quelle che possiamo considerare le cellule germinali presuntive derivate dal sottostar ectoderma. Gli abbozzi ovarici si formano nei primi cinque segmenti addominali.

SUMMARY OF THE EFFECTS OF IONIZING AND UV RADIATIONS ON ROOT-TIPS OF *SCILLA OBTUSIFOLIA* POIR.

GIUSEPPE MARTINOLI

Istituto di Botanica dell'Università, Pisa.

Received: 12th March 1961*

The effects produced by ionizing and UV radiations on the apical meristems of plants, have been mainly studied on species of the genera: *Tradescantia*, *Scilla*, *Allium*, *Triticum*, *Narcissus*, *Bellevalia*, *Zea Mais*, *Trillium*, which all have a low number of big chromosomes.

Since 1950 I have started to study the effects of ionizing radiations on the apical meristems of *Scilla obtusifolia* Poir. (MARTINOLI 1952). This species is particularly convenient for the purpose because its chromosomes besides being few ($2n = 8$; MARTINOLI 1949) and big are distinctly different in size and shape (Fig. 1) so to allow clear observation of the lesions.

The four pairs of homologous chromosomes A, B, C and D (Fig. 2) differ as follows: the « A » pair has an « intercalary trabant »; the « B » pair has the centromere in a submedian position; the homologous pairs « C » and « D » both have a centromere in submedian position but can be distinguished by their size.

Different doses of X rays, varying from 3,000 to 15,000 r, were given to dry seed and to seedlings (MARTINOLI 1953). As source of UV radiations a Burdick U.A. 250 N camp. of the Burdick corp. Milton-Wisconsin (110 volt and 60 cycles) without filter, was used.

Observations were made from 48 h. to three weeks after germination. Chromosomal aberrations, namely fragmentations, anaphase telophasic bridges and c-mitotic defects were noted to be more frequent and important after 3,000 r, 6,000 r, 9,000 r, and 15,000 r. With 15,000 r and more, a complete mitotic inhibition, with many regenerating cells and nuclei, was observed. Only occasionally the mitotic activity was partially restored after a week.

As a consequence of doses ranging from 3,000 to 9,000 r, numerous tetraploid ($2n = 16$), octoploid ($2n = 32$), sixteenploid ($2n = 64$) and even higher polyploid nuclei were detected. On the other hand we observed also the chromosomal pseudoreduction ($2n = 4$), which is explained as due to stickiness of the chromosomes, and to the block of their division.

The UV radiations caused in the homologous chromosomes « A », which

* Lavoro pubblicato con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

posses an « intercalary trabant », the phenomenon of misdivision and in some cases of shattering. The misdivision may affect: 1) the centromere, 2) the intercalary trabant, 3) the secondary constriction (Fig. 3). In all these cases centric and acentric fragments occur and these, during the ana-telophase, can form bridges and slow down chromosomes.

With lower doses of ionizing radiations (MARTINOLI 1958) (500 to 1,500 r)

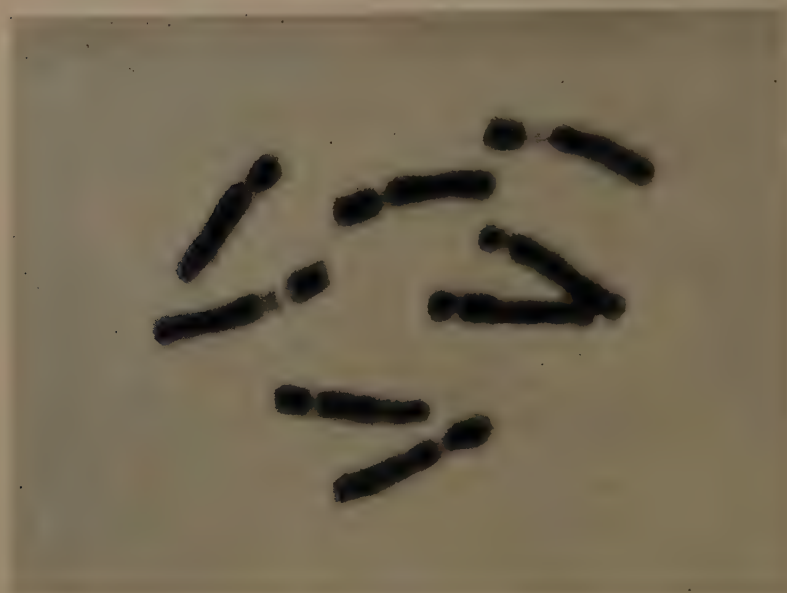


Fig. 1. — Caryogram of *Scilla obtusifolia* Poir. reproduced by a meristematic cell of the root tip ($2n = 8$). $\times 2500$ ab.

chromosomal aberrations were present only in the homologous chromosomes « A », although with a frequency much lower than at higher doses.

The homologous chromosomes « A » are therefore more sensitive than the other ones to ionizing radiations.

Using these lower doses we have never noted aberrations like stickiness, pseudoreduction or poliploidy which are frequent as a consequence of higher ones.

In *Scilla obtusifolia* after UV radiations treatment an increase of cell size in the region of elongation of the root tip and at the level of the apical cells was observed. This phenomenon has already been described, namely by GRAY (1951) in *Vicia faba* and by LEVAN (1939) in *Allium cepa*. In *Scilla obtusifolia* also chromosomal aberrations in the cells of the tips were observed (MARTINOLI 1953, 1954).

The « A » pair of homologous chromosomes showed, after UV radiation

reatment, the transversal division (misdivision), while the other chromosomes showed sometimes clear fragmentations (MARTINOLI 1957) like those observed by DOVELACE (1954); fragments, bridges, centric and acentric chromosomes were also

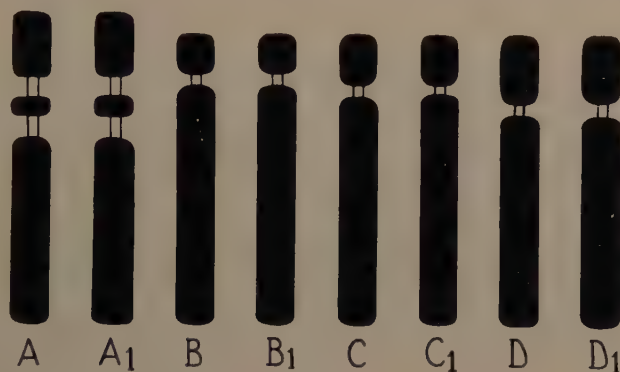


Fig. 2. — Ideogram of *Scilla obtusifolia* Poir. showing the four pairs of homologous chromosomes. Only the « A » pair has an intercalary trivalent.

very frequently observed. On the contrary pseudoreduction, stickiness and polyploidy, appear to be absent after UV radiation treatment.

UV radiation causes curvatures of the region of elongation of the root tip similar to those observed by BRUMFIELD (1953) in the root tips of *Phleum pratense*.

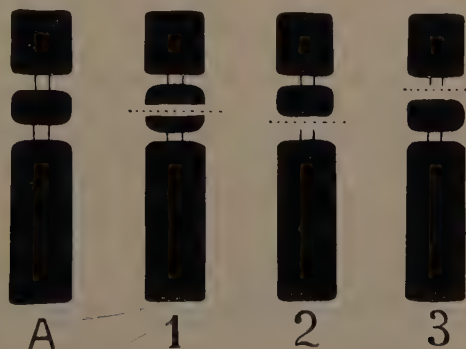


Fig. 3. — Chromosome sketch of the « A » pair with the intercalary trivalent. It is possible to observe the different modes of breakage which more frequently occur in the constrictions.

The centric and acentric fragments produced by both ionizing and UV radiations may last for a long time in the cytoplasm, but finally they are absorbed by the nucleus and disappear.

The cytological and chromosomal effects of ionizing and UV radiation in *Scilla obtusifolia* are similar to those previously observed in other species; but the mechanism of lesion may be better studied in this species on account of its few, easily distinguishable chromosomes.

It will be very interesting for future research to observe the effects of gamma radiations and of fast neutrons in the same biological test. At the present time we are working in this field for this purpose.

REFERENCES

- BRUNFIELD R. T., 1953. — *The effect of ultraviolet irradiation on cell division and elongation in timothy roots*. Proc. Natl. Aca. Sci., **39**: 366-371.
- , 1953. — *Conservatures in timothy roots induced by ultraviolet radiation*. Amer. Journ. Bot., **40**: 615-617.
- GRAY L. H., 1951. — *The effect of ionizing radiations on the broad bean root. Part VIII. Growth rate studies and histological analyses*. British Journ. Rad., **24**: 82-92.
- LEVAN A., 1939. — *Cytological phenomena connected with the root swelling caused by growth substances*. Hereditas, **25**: 87-96.
- LOVELACE R., 1953. — *The shattering of Tradescantia by ultraviolet radiation (2650 Å)*. Genetics, **38**: 675-676.
- , 1954. — *Chromosome shattering by ultraviolet radiation (2650 Å)*. Proc. Natl. Acad. Sci., **40**: 1129-1135.
- MARTINOLI G., 1949. — *Ricerche citotassonomiche sui generi Urginea e Scilla della Flora Sarda*. Caryologia, **1**: 329-357.
- , 1952. — *Effetti citologici indotti da raggi X su meristemi di Scilla obtusifolia Poir.* Caryologia, **5**: 52-85.
- , 1953. — *Effetti citologici indotti da raggi ultravioletti su cellule meristemiche apicali di Scilla obtusifolia Poir.* Atti IX Congr. Intern. Genetica, Bellagio 1953, Caryologia, Suppl. al **6**: 1100 (1954).
- , 1954. — *Mutazioni cariologiche indotte da raggi ultravioletti su cellule apicali di Scilla obtusifolia Poir.* Caryologia, **6**: 194-208.
- , 1954. — *Studio citoistologico delle curvature prodotte dalle radiazioni ultraviolette sui apici radicali di Scilla obtusifolia Poir.* Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **61**: 463-474.
- , 1957. — *Fenomeni di divisione trasversale (misdivision) e di frammentazione (shattering) prodotti dalle radiazioni ultraviolette su cromosomi di cellule apicali di Scilla obtusifolia Poir.* Atti III Riun. Ass. Gen. Ital. in Pisa, 1956, suppl. « La Ricerca Scientifica », **27**: 121-126.
- , 1958. — *Cytological and histological effects of ionizing radiations on root tips of Scilla obtusifolia Poir.* Proc. of the Internat. Congress of Radiation Research, Burlington, 1958.

RIASSUNTO

L'Autore riferisce sulle ricerche, che egli ha eseguito dal 1950 in poi, degli effetti prodotti dalle radiazioni ionizzanti e ultraviolette sulle cellule meristematiche apicali di *Scilla obtusifolia* Poir.

Questa specie è caratterizzata dalla semplicità del kariogramma, che possiede quattro coppie di cromosomi omologhi nel diploide ($2n = 8$) distinguibili molto facilmente per forma e grandezza. Singolare è la coppia « A » che possiede un satellite intercalare.

Le cellule trattate con raggi X a differenti dosi da 3.000/r a 15.000/r hanno mostrato delle anomalie note per tali dosi, usate su altre specie da altri ricercatori, ed in particolare: fratture cromosomiche, ponti anafasici, fenomeni di poliploidia e di pseudoriduzione: a dosi elevate è stata notata la completa inibizione mitotica.

I trattamenti con le radiazioni ultraviolette hanno dato un risultato sensibilmente diverso: un numero ridotto di fratture, scarsi ponti anafasici; più frequentemente hanno dato anomalie nella regione centromerica della coppia « A » con fenomeni di divisione trasversale.

Le ricerche con raggi molli sono in programma.

CHROMOSOME CYTOLOGY OF A SNAKE, *LYCODON AULICUS* L. (COLUBRIDAE, OPHIDIA)

A. N. BHATNAGAR

Department of Zoology, D.A.V. College, Kanpur, India

Received: 30th May 1960

INTRODUCTION

NAKAMURA (1935) formulated $10 V's + 6 R's + 20 D's = 36$ as the fundamental chromosome complex for the snakes, specifically so for the members of the families Colubridae and Viperidae. Also from the perusal of the literature available on the chromosomes of the snakes (NAKAMURA 1928, 1935; MATTHEY 1931, 1933, 1949; MAKINO and MOMMA 1949; BHATNAGAR 1957, 1959a, 1959b, 1960), it appears that a maximum of 10 V-shaped metacentrics are generally observed in an ophidian karyotype. The chromosome complex of the animal under investigation shows certain interesting deviations from the so far studied cases and appears to be worth reporting. As also the material was available in abundance, the details of the various stages of meiosis have also been worked out.

MATERIAL AND METHODS

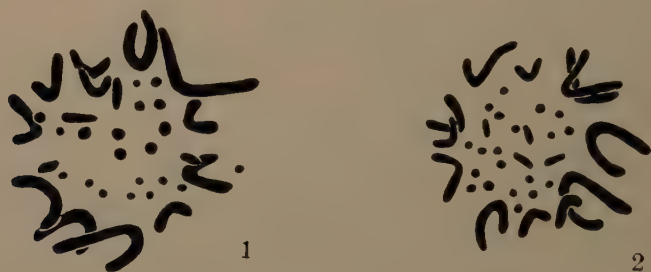
Testes of a number of specimens of *Lycodon aulicus* were fixed in Champy's fluid modified by NAKAMURA (1928) for 24 hours at room temperature. Cold fixation was also found to be useful especially during the summer season when the atmospheric temperature ranged between 35°-40° C. The material was then properly dehydrated and embedded in paraffin. Sections were cut 10-12 micra thick. Before staining, the sections were bleached with 4% solution of hydrogen peroxide in 50% alcohol and then soaked in Chura's fluid (CHURA 1925) for 12 hours. Newton's gentian violet, Heidenhain's iron-haematoxylin and Feulgen's reagent (Coleman's method) were employed as stains. Squash preparations of the fresh material were also prepared according to the techniques described by MAKINO and NISHIMURA (1952) and MATTHEY (1953). Figures were drawn with the help of camera lucida, using a Leitz 1/12 oil-immersion objective and a 25X ocular, at a level about 12.5 cm below the microscope stage. The magnification of all the figures is 4,000 times.

OBSERVATIONS

Germatogonial mitosis.

The diploid karyotype of *Lycodon aulicus* (Figs. 1, 2) presents 36 chromosomes, which consist of 16 macro- and 20 micro-chromosomes. Macro-chromo-

somes, which generally constitute a peripheral ring at the spermatogonial metaphase, consist of 12 V-shaped and 4 rod-shaped elements. On the basis of the difference in size, the V-shaped chromosomes have been divided into three different size groups (Figs. 15, 16) i.e. large ones (pairs A and B), medium-sized



Figs. 1 and 2. — Spermatogonial metaphase plates (polar view).

(pairs C and D) and small ones (pairs E and F). All the V-shaped chromosomes are submedially attached to the spindle fibres. Of the two pairs of acrocentric chromosomes, one pair is distinctly smaller in size than the other. Micro-chromosomes consist of small dot-shaped bodies of variable sizes and are scattered inside the ring formed by the macro-chromosomes. These appear to possess terminal spindle fibre attachment. Iron-haematoxylin as well as gentian violet stain the chromosomes fairly well but Feulgen's reagent is not very satisfactory. The chromosome complement of the male karyotype of *Lycodon aulicus* is:

$$12 \text{ V's} + 4 \text{ R's} + 20 \text{ D's} = 36$$

Meiosis.

The nucleus in the resting stage shows a number of deeply-stained bodies, the nature of which cannot be determined. This stage seems to continue for a pretty long period as such cells are abundantly found in the sections. When the breeding season approaches, the nuclei of the resting cells begin to grow rapidly and come to contain a number of chromatin lumps. The leptotene threads are quite slender and give the appearance of a tangled mass, showing no sign of polarization (Fig. 3). These threads react poorly to nuclear dyes and remain completely unstained, but a number of deeply-stained heterochromatic chromosome segments are observed. Diffuse nature of the zygotene threads presents difficulty in working out the details of this stage. The pachytene nucleus (Fig. 4) shows the bivalents which have become considerably thickened. Their ends are clearly seen and bear heterochromatic, Feulgen-positive knobs. The pachytene threads do not bear 'lampbrush' fibres. In the diplotene nucleus

fig. 5), 18 bivalents are clearly observed which consist of 8 bigger and 10 smaller elements. Out of 8 bigger bivalents, 6 are quite long and, presumably, correspond to 12 V-shaped macro-chromosomes of the spermatogonial metaphase, while the remaining two are much shorter. Five of these six bigger tetrads show four chiasmata each, while the sixth one has either two or three. The remaining



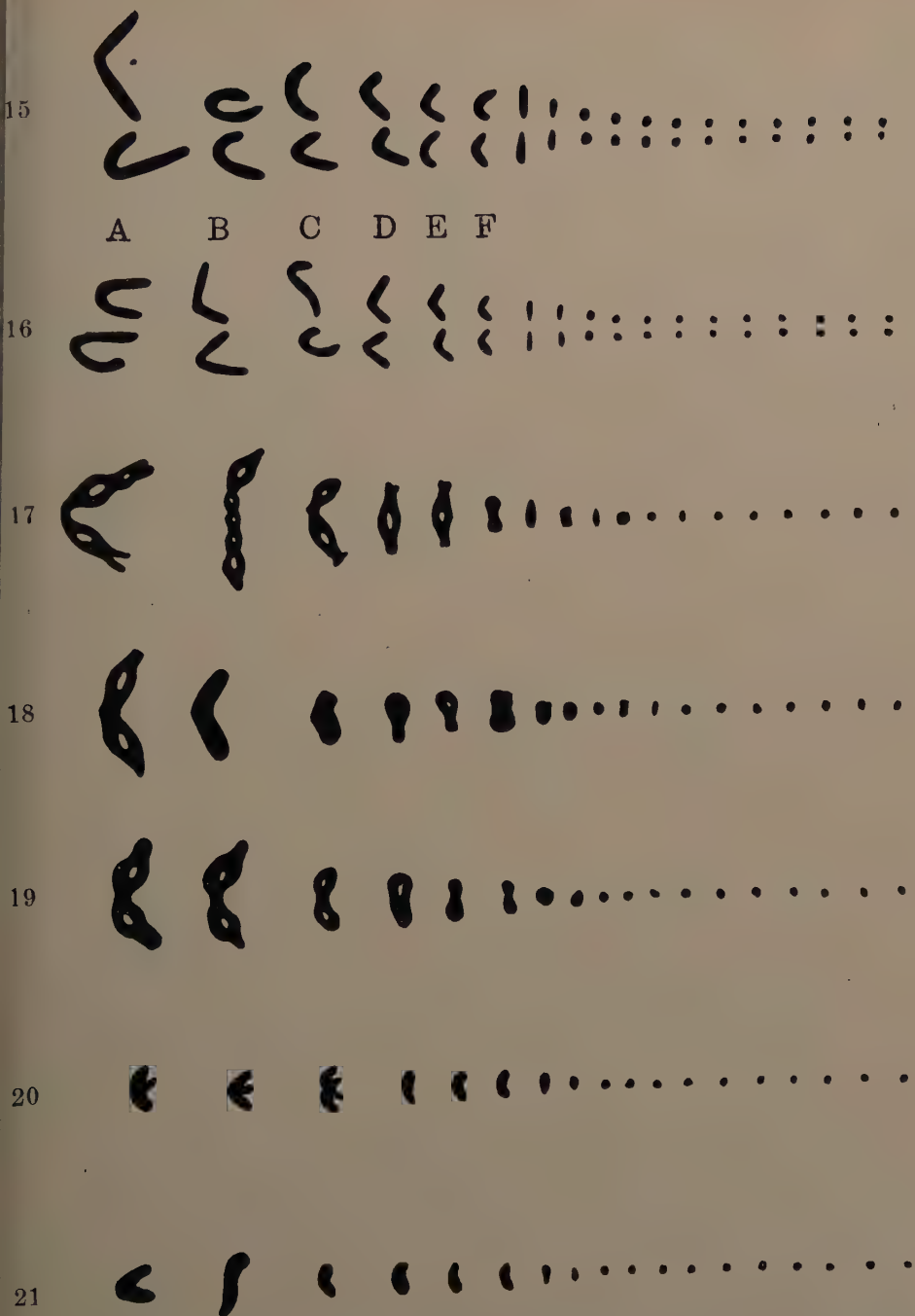
- g. 3. — Leptotene nucleus showing a meshwork of fine threads.
 g. 4. — Pachytene nucleus; ends of bivalents show heterochromatic knobs.
 g. 5. — Diplotene nucleus.
 g. 6. — Diakinesis nucleus showing 18 bivalents.
 gs. 7, 8 and 9. — First meiotic metaphase plates (polar view).
 g. 10. — First meiotic anaphase (polar view).
 gs. 11 and 12. — Second meiotic metaphase plates (polar view).
 g. 13. — Second meiotic anaphase (polar view).
 g. 14. — Tetraploid second spermatocyte, showing 36 univalent chromosomes (polar view).

two have a pair each. The smaller tetrads, which are 10 in number and are dumbbell- and dot-shaped, apparently do not show any chiasmata. In the diakinesis nucleus (Fig. 6) although reduction in the number of chiasmata takes place, the two biggest tetrads continue to hold 4-5 chiasmata each while the third one shows 3 and the remaining, 2 chiasmata each. Moreover, at this stage some of the bigger elements are bent at fixed positions, probably indicating the location of the spindle fibre attachment.

In polar view of the first metaphase (Figs. 7, 8, 9), 18 elements are always seen arranged in the typical reptilian fashion. There are present 8 macro- and 10 micro-tetrads. At the early metaphase, out of 8 macro-tetrads, 6 are multipolar ring tetrads and are dispersed on the periphery of the equatorial plate. The remaining two are generally placed inside this peripheral ring and are rod-shaped. The micro-tetrads are all dot-shaped bodies. It has also been observed that at the early first metaphase (Fig. 7), the macro-tetrads hold more of chiasmata than at late metaphase. Few of the chiasmata appear to have become fused and thus reduction in their number takes place. Some tetrads which have 5 or 6 chiasmata at the early metaphase may have only three or four at the late metaphase. All the tetrads appear to be uniformly stained with gentian violet. The chromosomes are widely spaced from one another and are free from inter-chromosomal connecting strands. The early metaphase chromosomes stain lightly while those of the late metaphase take up deeper stain.

During the first anaphase (Fig. 10), the paired homologues separate normally and pass to the opposite poles nearly all at the same time. The anaphase chromosomes have a tendency to clump together even in the best fixed cells and therefore, it is difficult to count the number either in the side or the polar view. Interkinesis is of a short duration.

The second metaphase complement (Figs. 11, 12) again shows 18 chromosomes, consisting of 8 macro- and 10 micro-dyads; of these 8 macro-dyads, 6 are V-shaped and 2 rod-shaped. The micro-dyads are all dot-shaped bodies. It is not unusual for most of the macro-elements to divide precociously, with the result that the V-shaped chromosomes appear as double V's, indicating that the component monads or chromatids are attached to each other only at the point where the centromeres are situated. In the ensuing division, the chromatids separate as usual and move to their respective poles. No precession or succession of any element takes place. In the polar view (Fig. 13) two groups of chromatids are satisfactorily seen. The staining capacity of the chromosomes at the second anaphase is almost the same as that of the chromosomes at the second metaphase. Only one type of spermatids are produced. The V-shaped chromosomes are easily recognized from the rest but it is difficult to distinguish between the small rod-shaped and dot-shaped chromosomes. The staining reaction of the spermatid chromosomes is feeble.



Figs. 15 and 16. — Serial arrangement of the spermatogonial chromosomes, corresponding to figs. 1 and 2, respectively.

Figs. 17, 18 and 19. — Serial arrangement of the first meiotic metaphase chromosomes, corresponding to figs. 7, 8 and 9.

Figs. 20 and 21. — Serial arrangement of the second meiotic metaphase chromosomes, corresponding to figs. 11 and 12.

Few tetraploid second spermatocytes are also observed with 36 univalent chromosomes (Fig. 14).

DISCUSSION

Chromosome morphology.

The karyotype of *Lycodon aulicus* is peculiar in the sense that it possesses 12 V-shaped metacentric chromosomes. Such a high number of V-shaped metacentrics has not yet been reported from the order Ophidia, although, 12 V-shaped metacentric chromosomes occur quite often in the karyotypes of lacertilians (MATTHEY 1931, 1949; NAKAMURA 1932; BHATNAGAR 1956). The highest number of V-shaped chromosomes so far reported from the snakes is 10 (NAKAMURA 1935) and are observed in the karyotypes of many Colubrid forms. According to the formulations of NAKAMURA (1935), ten V-shaped chromosomes are present basically in many of the karyotypes found in the families Colubridae and Viperidae and the fundamental chromosome number is 46. The fundamental chromosome number of 48 (which is the case in *Lycodon aulicus*) has also been calculated out by NAKAMURA for the karyotypes of *Macropisthodon* and *Dinodon*. According to SMITH (1948, p. 256), *Lycodon* and *Dinodon* are closely related genera and the similarity in the fundamental chromosome number lends support to it. But it is interesting to note that *Lycodon* has 12 V-shaped chromosomes, whereas, *Dinodon* has only a pair. However, this difference in the karyotype of *Lycodon* and *Dinodon* can be explained in the light of Robertson's law (ROBERTSON 1916).

Dot-shaped and m-chromosomes.

There occur a number of small round and oval chromosomes in the karyotype of *Lycodon aulicus* which generally occupy a central position in the spindle. OGUMA, quoted by NAKAMURA (1935), states that it is more reasonable to call these chromosomes « spherule, spherochromosome or spherosome ». But it appears from the literature that this terminology has hardly been adopted by any worker on the chromosomes of reptiles, therefore, the present author also prefers to call these elements as simply dot-shaped chromosomes.

Recently, NOGUSA (1953) while working on the chromosomes of *Takydromus smaragdinus* and *T. tachydromoides* has found a pair of small dot-shaped chromosomes, which are termed by him as m-chromosomes. He further states that in *T. tachydromoides*, these are very minute, so minute that it is difficult to distinguish them from the centromere, suggesting a condition one step prior to total disappearance. Such a condition leading to total disappearance has also been reported by OGUMA (1930), OGUMA and ASANA (1932) and KICHIJO (1939) in dragonflies; by MOMMA (1943) in grasshoppers and MAKINO (1934) in some

dents. It may be added that these workers have held the smallest pair of chromosomes, in each of these animals, to correspond to the m-chromosomes of the Coreidae (WILSON 1910, 1911, 1932).

The m-chromosomes of the Coreidae, as is well known, are characterised by non-association during meiotic prophase. Therefore, the present author thinks that the term m-chromosome should be strictly restricted to chromosomes exhibiting the 'anomalous' behaviour characteristic of the m-chromosomes of the Coreidae, a condition scarcely fulfilled by any of the dot-shaped chromosomes of reptiles.

It would, therefore, seem justifiable not to designate the small dot-shaped chromosomes of *Takydromus smaragdinus* and *T. tachydromoides* as m-chromosomes. It may be true that they correspond to small dot-shaped chromosomes of certain dragonflies, grasshoppers and rodents but in no case are these comparable to the m-chromosomes of the Coreidae.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was done under the guidance of Prof. M. D. L. SRIVASTAVA, Head of the Zoology Department, University of Allahabad (India), to whom I am greatly indebted. I am also thankful to Dr. B. C. MAHENDRA of the Agra College, Agra and Dr. M. N. ACHARJI of the Section of Herpetology, Zoological Survey of India, Calcutta, for the identification of the material.

REFERENCES

- CHATTOPADHYAY A. N., 1956. — *Spermatogonial chromosomes of Riopa punctata* (Gmelin). *Curr. Sci.*, **25**: 402-403.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1957. — *Spermatogonial chromosomes of the Indian rat snake — Ptyas mucosus* Linn. *Curr. Sci.*, **26**: 154-155.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1959a. — *Studies on the structure and behaviour of chromosomes of two species of Colubrid snakes*. *Caryologia*, **12**: 349-361.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1959b. — *Studies on the structure and behaviour of chromosomes of Oligodon arnensis* Shaw. *Cytologia*, **24**: 459-465.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1960. — *Chromosomes of Bungarus caeruleus* Schneider (Elapidae-Ophidia). *Cytologia*, **25**: 173-178.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1925. — *Beitrag zur fixation der Mitochondrien*. *Z. Wiss. Mikr.*, **42**: 55-60.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1939*. — *Chromosomes of Tachopteryx pryeri and Gomphus hakiensis* (Odonata: Aeschnidae). *Jap. J. Genet.*, **15**.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1943. — *The chromosome complexes in goat (Capra hircus) and sheep (Ovis aries) and their relationship*. *Cytologia*, **13**: 39-54.
- CHATTOPADHYAY A. N. and MOMMA E., 1949. — *An idiogram study of the chromosomes in some species of reptiles*. *Cytologia*, **15**: 96-108.
- CHATTOPADHYAY A. N. and NISHIMURA I., 1952. — *Water-pretreatment squash technic*. *Stain Technol.*, **24**: 1-7.
- CHATTOPADHYAY A. N., 1931. — *Chromosomes de Reptiles, Sauriens, Ophidiens, Cheloniens. L'évolution de la formule chromosomiale chez les Sauriens*. *Rev. Suisse Zool.*, **38**: 117-186.

* Not consulted in original.

- MATTHEY R., 1933. — *Nouvelle contribution a l'étude des chromosomes chez les Sauriens*. Rev. Suisse Zool., **40**: 281-318.
- , 1949. — *Les chromosomes des vertebres*. Rouge, Lausanne.
- , 1953*. — *Cytologie comparee et Taxonomie des Chamaeleontidae (Reptilia-Lacertilia)*. Rev. Suisse Zool., **60**.
- MOMMA E., 1943. — *A karyogram study on eighteen species of Japanese Acrididae (Orthoptera)*. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. (Zool.), **9**: 59-69.
- NAKAMURA K., 1928. — *On the chromosomes of snake, Natrrix tigrina*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ., Ser. B, **4**: 1-8.
- , 1932. — *Studies on reptilian chromosomes. III. Chromosomes of some geckos*. Cytologia, **3**: 156-168.
- , 1935. — *Studies on reptilian chromosomes. VI. Chromosomes of some snakes*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Univ., Ser. B, **10**: 361-402.
- NOGUSA S., 1953. — *A study of the chromosomes of some lizards, with special remark on the m-chromosomes*. Cytologia, **18**: 29-35.
- OGUMA K., 1930. — *A comparative study of the spermatocyte chromosome in allied species of the dragonflies*. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser. VI, **1**: 1-32.
- OGUMA K. and ASANA J. J., 1932. — *Additional data to our knowledge of the dragonfly chromosomes with a note on occurrence of XY-chromosome in the ant lion (Neuroptera)*. J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. (Zool.), **1**: 133-142.
- ROBERTSON WM. R. B., 1916. — *Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown by the chromosomes of Tettigidae and Acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Gryllidae. Chromosomes and variation*. J. Morphology, **27**: 179-331.
- SMITH M. A., 1943. — *The Fauna of British India. Amphibia and Reptilia*. Vol. III.
- WILSON E. B., 1910. — *Studies on chromosomes. VI. A review of chromosome combinations in Metapodius*. J. Exptl. Zool., **9**: 53-78.
- , 1911. — *Studies on chromosomes. VII. A review of the chromosomes of Nezara; with some more general considerations*. J. Morph., **22**: 71-110.
- , 1932. — *Polyploid and metaphase patterns*. J. Morph., **53**: 443-471.

SUMMARY

1. The diplo male karyotype of *Lycodon aulicus* L. shows 36 chromosomes, consisting of 12 V-shaped, 4 rod-shaped and 20 dot-shaped bodies. Twelve V-shaped metacentrics are being reported for the first time to occur in a karyotype of a snake.
2. The fundamental chromosome number is 48.
3. Meiosis runs normally in this species and the males are homogametic.
4. Few tetraploid secondary spermatocytes with 36 univalent chromosomes are observed.
5. Dot-shaped chromosomes are not comparable to m-chromosomes of Coreidae.

RIASSUNTO

1. Il cariotipo diploide maschile di *Lycodon aulicus* L. mostra 36 cromosomi e consiste di 12 corpi a V, di 4 a forma di bastoncino e di 20 rotondeggianti. Per la prima volta in un cariotipo di serpente sono stati rinvenuti 12 cromosomi metacentrici a forma di V.
2. Il numero cromosomico fondamentale è 48.
3. In questa specie la meiosi decorre normalmente; i maschi sono omogametici.
4. Sono stati osservati pochi spermatociti secondari tetraploidi con 36 cromosomi univalenti.
5. I cromosomi rotondeggianti non sono paragonabili ai m-cromosomi delle Coreidae.

* Not consulted in original.

L'AZIONE DEL GENE *am* SULL'APPARATO NUCLEARE DI *PARAMECIUM AURELIA* DURANTE LA RIPRODUZIONE VEGETATIVA E SESSUALE IN RELAZIONE ALL'ETÀ DEL CLONE ED ALLA TEMPERATURA DI ALLEVAMENTO DEGLI ANIMALI

RENZO NOBILI

Istituto di Zoologia e Anatomia Comparata dell'Università, Pisa

*In Redazione: il 4 Febbraio 1961 **

INTRODUZIONE

L'apparato nucleare di *Paramecium aurelia* è formato di norma da un macronucleo e da due micronuclei di tipo vescicolare, addossati o sempre molto vicini al macronucleo. Durante la riproduzione asessuata per scissione, il macronucleo si divide in 2 parti, più o meno uguali, mediante un processo cosiddetto mitotico, mentre i micronuclei si dividono entrambi mitoticamente, sì che alla separazione del citosoma sia il proter (organismo anteriore) che l'opiste (organismo posteriore) ricevono ciascuno metà del macronucleo e 2 micronuclei.

Dopo cariogamia, che avviene ad ogni processo sessuale di qualsiasi natura sia in *P. aurelia*, dal sincarion si formano, mediante due divisioni mitotiche successive, 4 nuclei: 2 si differenziano negli *anlagen* (abbozzi) dei macronuclei (*ma-anlagen*), 2 rimangono come micronuclei funzionali. Alla prima divisione dopo cariogamia si ha la segregazione dei 2 *ma-anlagen*, uno per ciascun individuo, mentre i 2 micronuclei si dividono rimanendo 2 nel proter e 2 nell'opiste. Si ha così il ristabilimento dell'apparato nucleare normale di *P. aurelia*. Questo regolare andamento della riproduzione dei nuclei viene disturbato durante l'invecchiamento di un clone; si possono in tal caso avere più o meno di 2 micronuclei per individuo ed una ripartizione irregolare del macronucleo, come pure un numero diverso da 2 di *ma-anlagen* dopo cariogamia in individui molto vecchi (DIPPEL 1955; MITCHISON 1955). D'altra parte SONNEBORN (1940) aveva notato che, dopo rigenerazione del macronucleo, fra le linee vitali rigenerate si poteva avere scomparsa dei micronuclei. Se si eccettuano questi casi particolari non mi risulta che variazioni a carico dell'apparato nucleare siano conosciute in *P. aurelia*. Nel 1954, fra i vari mutanti prodotti mediante irradiazione con raggi

* Le ricerche sono state svolte nel laboratorio del Prof. T. M. SONNEBORN del Department of Zoology, Indiana University, Bloomington, Ind. USA, e sovvenzionate, in parte dal PHS Genetics Training Grant 2G-82, e in parte da contributi concessi al prof. T. M. SONNEBORN dall'Atomic Energy Commission. L'A. aveva ottenuto un Fulbright Travel Grant per recarsi in USA nel 1958.

U.V., SONNEBORN ne isolò uno che presentava delle anomalie durante i processi riproduttivi. In una breve nota, SONNEBORN (1954) descrisse tali anomalie, causate da un gene *am* allo stato omozigote, come segue: distribuzione irregolare del macronucleo agli individui figli con formazione di amacronucleati in percentuale variabile; irregolare distribuzione dei micronuclei durante la riproduzione vegetativa ed anche dei ma-anlagen nelle prime divisioni dopo cariogamia.

Studiando lo stesso stock di *P. aurelia* ottenuto dal SONNEBORN, ho potuto rilevare alcune relazioni fra l'azione del gene *am* e l'età del clone, nonché la temperatura di allevamento, che espongo nel presente lavoro.

MATERIALE E TECNICA

Sono stati usati principalmente gli stock d4-39 e d4-47 omozigoti per *am* derivati dallo stock 51, syngen 4 di *Paramecium aurelia*. Va detto subito che i fenomeni osservati in questi due valgono anche per altri stocks, esaminati però con minor cura, in cui il gene *am* si trova pure allo stato omozigote. Ciò non esclude comunque la possibilità di una diversa azione di tale gene quando fosse in combinazione con genotipi diversi.

La tecnica di coltura è stata quella standard descritta da SONNEBORN (1950), basata su infuso di lattuga inoculato con *Aerobacter aerogenes* come cibo. Gli animali sono stati tenuti a temperatura costante di 27° C., eccetto il breve periodo durante il reisolamento giornaliero delle varie linee in esame. Per lo studio del macronucleo durante la riproduzione vegetativa sono stati seguiti molti cloni, tutti appartenenti allo stock d4-39, ciascuno formato da 2 linee. Il reisolamento giornaliero permette una conta abbastanza accurata del numero di divisioni per ciascuna linea, ogni 24 ore, sì da avere una misura sufficientemente esatta dell'età del clone; nello stesso tempo riduce la possibilità che gli animali entrino in autogamia (SONNEBORN 1938). È stato registrato accuratamente solo il numero di amacronucleati presenti fra gli esemplari di ciascuna linea subito dopo compiuto il reisolamento. Come colorante per il macronucleo è stato usato l'aceto-carminio. L'esame citologico giornaliero di tutti gli animali rimasti dopo il reisolamento permette anche di scoprire eventuali organismi in autogamia nelle colture. Linee con animali autogamici vengono sostituite con linee sorelle ugualmente vecchie se disponibili, altrimenti tale clone viene abbandonato.

La distribuzione dei micronuclei è stata studiata particolarmente in animali in divisione appartenenti allo stock d4-47. Come colorante nucleare si è usato, nei preparati permanenti, la fucsina basica previa idrolisi in acido cloridrico normale e la feulgen; per preparati temporanei una nuova tecnica introdotta dalla DIPPEL (*non pubblicato*) basata su una soluzione di orceina in acido acetico applicata dopo fissazione con Gilson. Tale colorazione mette bene in evidenza l'apparato nucleare ed anche le particelle kappa del citoplasma.

La segregazione irregolare dei 2 ma-anlagen alla prima divisione post-autogamica è stata seguita in animali di varia età appartenenti allo stock d4-39; il procedimento è il seguente: induzione di autogamia in 6 cloni diversi ogni 10 divisioni, separazione degli animali in 2 gruppi, di cui uno posto ad una temperatura di 19° C., l'altro ad una

27° C., all'interno di ciascun gruppo gli animali sono poi isolati ad uno ad uno. Gli animali sono poi esaminati mediante colorazione con l'aceto-carminio, in divisione sempre prima del manifestarsi della seconda divisione post-autogamica, contando quelli che presentano i 2 ma-anlagen in uno solo dei due individui figli.

RISULTATI

1 - Venticinque cloni appartenenti allo stock d4-39 sono stati seguiti particolarmente per lo studio della distribuzione del macronucleo durante la riproduzione vegetativa. È abbastanza facile contare il numero di amacronucleati che si formano in ciascuna linea di ogni clone, più difficile invece è la valutazione della distribuzione irregolare del macronucleo. Questa si presenta infatti con tutte le

TABELLA I

Incremento di amacronucleati in relazione all'età riscontrato in 12 cloni che terminarono per morte dopo un massimo di 75 divisioni.

| Età espressa in N° di divisioni | N° totale di animali esaminati | N° totale di amacronucleati | % |
|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------|
| 15 | 705 | 79 | 11,2 |
| 25 | 495 | 58 | 11,7 |
| 35 | 492 | 83 | 16,9 |
| 45 | 457 | 110 | 24 |
| 55 | 414 | 116 | 28 |
| 65 | 355 | 97 | 27,3 |
| 75 | 113 | 43 | 38 |

gradualità possibili; cioè il proter o l'opiste possono ricevere da $\frac{1}{30}$ a più di $\frac{1}{2}$ del macronucleo totale. Per cogliere queste differenze bisogna colorare gli animali in divisione già avanzata, altrimenti la piccola porzione di macronucleo ricevuta da un individuo si accresce sì che dopo un certo tempo il macronucleo si presenta completamente identico a quello di un organismo originatosi da una divisione normale. Ma questo problema, che ha strette relazioni con lo sviluppo e col variare del rapporto nucleo-plasmatico, sarà trattato a parte. Qui mi limiterò a riferire circa l'incremento osservato di amacronucleati in relazione al numero di scissioni a cui sottostanno i cloni. In una breve nota (NOBILI 1959) avevo sunteggiato i risultati che ora sono esposti nelle tabelle I e II. Le due tabelle indicano lo stesso fenomeno, ma ho creduto

opportuno tenerle distinte perchè la prima include cloni che terminano tutti con la morte ed abbastanza precocemente; la seconda invece include cloni che vengono abbandonati perchè trovati in autogamia. I risultati appaiono evidenti nella tabella I si passa da una percentuale di amacronucleati dell'11,2 dopo 13 divisioni a quella di 38,01 dopo 75 divisioni; nella tabella II si sale dal 14,1%

TABELLA II

Incremento di amacronucleati in relazione all'età riscontrato in 13 cloni che terminarono per autogamia in maggioranza.

| Età espressa in N° di divisioni | N° totale di animali esaminati | N° totale di amacronucleati | % |
|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------|
| 15 | 671 | 95 | 14,1 |
| 25 | 878 | 156 | 17,8 |
| 35 | 749 | 148 | 19,7 |
| 45 | 595 | 118 | 19,8 |
| 55 | 551 | 144 | 26,1 |
| 65 | 454 | 109 | 24 |
| 75 | 472 | 118 | 25 |
| 85 | 418 | 110 | 26,3 |
| 95 | 146 | 48 | 32,9 |
| 105 | 126 | 43 | 34,1 |

a 15 divisioni al 34,1% di amacronucleati dopo 105 scissioni. C'è quindi un aumento continuo di amacronucleati man mano che aumenta il numero delle scissioni vegetative a partire dall'ultima cariogamia. Contemporaneamente si manifesta anche una riduzione del ritmo di divisione che è considerata come indice dell'invecchiamento del clone. Pertanto si può dire che il formarsi di amacronucleati varia in dipendenza dell'età del clone nelle condizioni sperimentali seguite. La diminuzione degli animali esaminati durante gli ultimi periodi dell'esperimento va ascritta a due cause: riduzioni del numero dei cloni in esame dovuta alla morte di alcuni di essi; incremento di amacronucleati i quali non dividendosi ulteriormente portano ovviamente ad una diminuzione del numero totale di esemplari.

Esiste una certa variabilità tra i diversi cloni circa la penetranza ed anche la espressività del gene *am*. Confrontando le due tabelle si osserva infatti che all'età di 75 divisioni la percentuale di amacronucleati che si formano non è la stessa. Si può aggiungere ancora che la durata in vita di un clone omozigote pe

sembra dipendere dal numero di divisioni irregolari. In altre parole aumentando il numero di amacronucleati diminuisce la durata della vita di un clone. Questo spiegherebbe la maggior età dei cloni considerati nella seconda tabella. I dati qui non riportati concordano con questa conclusione che verrà discussa più a lungo nella discussione.

Teoricamente il gene *am*, con massima penetranza ed espressività, dovrebbe terminare la produzione di un amacronucleato ad ogni divisione, raggiungendo una percentuale di 50 ad ogni scissione. Ci si avvicina a questa percentuale teorica solo nella tarda età dei cloni. Tre cloni tuttavia hanno prodotto un amacronucleato ad ogni scissione e precisamente: uno per 7 divisioni tra la 63^a e la 70^a scissione; un secondo per 12 divisioni in 8 giorni fra la 68^a e la 80^a; ed un terzo per nove divisioni in 5 giorni tra la 74^a e la 83^a scissione. Contrapposti a questi tre cloni ne stanno altri in cui l'azione del gene *am* si è manifestata tardivamente e con una penetranza inferiore a quella media. Ciò indica appunto che a livello dei singoli cloni esiste una variabilità ancora più accentuata di quella indicata dalle tabelle.

2 - Il gene *am*, come già detto, influenza anche la distribuzione dei micronuclei durante le divisioni vegetative. Per studiare tale azione sui micronuclei è usato lo stock d4-47, prelevando da colture in reisolamento giornaliero animali in divisione e colorandoli sia con aceto-orceina che con Feulgen e fucsina. In tal modo, se la divisione è abbastanza avanzata, si può facilmente vedere come i micronuclei si distribuiscono al proter e all'opiste. Durante l'esperimento non vi è stata alcuna selezione circa il numero dei micronuclei fra gli esemplari isolati giornalmente. Nella prima divisione successiva ad un processo abituale i 2 micronuclei si dividono e si distribuiscono regolarmente. Alcuni individui si presentano irregolari nella seconda ed ancor più nella terza scissione; ma alla quarta divisione la percentuale di organismi con un numero anormale di micronuclei raggiunge il 32,3%. (I dati concernenti la quarta scissione post-

TABELLA III

Numero di micronuclei presenti alla quarta divisione dopo autogamia in animali in divisione.

| N° animali in divisione | N° di micronuclei | |
|----------------------------|-------------------|--------|
| | Proter | Opiste |
| 126 | 2 | 2 |
| 28 | 1 | 1 |
| 7 | 0 | 0 |
| 18 | 3 | 3 |
| 7 | 4 | 4 |

autogamica sono presentati nella tabella III). In seguito, man mano che ci si allontana dall'autogamia o coniugazione, cioè di pari passo con l'invecchiamento del clone, gli individui che presentano un numero di micronuclei diverso da 2 vanno aumentando. Nella tabella IV vengono dati il numero dei Parameci esaminati in

TABELLA IV
Distribuzione dei micronuclei in animali in divisione vegetativa di varia età.

| N° animali in divisione esaminati | N° di micronuclei | | % sul totale |
|---|-------------------|--------|--------------|
| | Proter | Opiste | |
| Gruppo 1 - 125 | 1 | 1 | 19,7 |
| 5 | 0 | 2 | |
| 4 | 2 | 0 | |
| Gruppo 0 - 12 | 0 | 0 | 1,7 |
| Gruppo 2 - 336 | 2 | 2 | 54,7 |
| 20 | 3 | 1 | |
| 16 | 1 | 3 | |
| 1 | 0 | 4 | |
| Gruppo 3 - 79 | 3 | 3 | 15,2 |
| 11 | 4 | 2 | |
| 11 | 2 | 4 | |
| 1 | 5 | 1 | |
| 1 | 1 | 5 | |
| Gruppo 4 - 35 | 4 | 4 | 6,4 |
| 4 | 5 | 3 | |
| 4 | 3 | 5 | |
| 1 | 6 | 2 | |
| Gruppo 5 - 4 | 5 | 5 | 1,0 |
| 1 | 6 | 4 | |
| 1 | 4 | 6 | |
| 1 | 2 | 8 | |
| Gruppo 6 - 4 | 6 | 6 | 1,0 |
| 2 | 5 | 7 | |
| 1 | 4 | 8 | |
| Gruppo 7 - 1 | 11 | 3 | 0,3 |
| 1 | 9 | 5 | |
| Totale 682 | | | 100 |

divisione ed il numero nonché il tipo di distribuzione dei micronuclei osservati. Questi dati, anche se ricavati tutti da 2 cloni, non sono stati elaborati in stretta connessione con l'età dei cloni stessi. Tuttavia sul totale degli esemplari in divisione (632) quelli con un numero di micronuclei anormale raggiungono il 50,7%, c'è quindi un aumento rispetto alla percentuale osservata alla quarta divisione di poco superiore al 18%. Dalla tabella IV si ricava inoltre che la segregazione

I micronuclei ad individui figli avviene in modo casuale, almeno qualitativamente, e per quanto concerne individui con un numero di micronuclei non superiore a 3. Sono cioè rappresentate tutte le classi possibili come se la distribuzione di micronuclei fosse puramente dovuta al caso. Ma se ciò fosse vero anche la loro frequenza dovrebbe essere uguale per classi di uno stesso gruppo, il che non si verifica affatto. Consideriamo infatti il gruppo con 1 micronucleo allo stadio di riposo: i 2 micronuclei presenti in divisione avanzata della cellula segregano regolarmente in 125 casi, mentre solo in 9 si ha una distribuzione irregolare di 2 da una parte e zero dall'altra. La stessa considerazione vale per il gruppo a 2 micronuclei: 336 individui con segregazione regolare e solo 37 con segregazione normale nelle 2 classi possibili di 3-1 e 4-0. Nel gruppo a 3 micronuclei osserviamo 79 individui con distribuzione regolare 3-3 contro 24 distribuzioni irregolari nelle classi di 4-2 e 5-1 (manca la classe 6-0). Del resto su un totale di 682 finali in divisione ben l'85,5% di essi mostra una segregazione regolare dei micronuclei indipendentemente dal loro numero. Ciò indica che c'è una forte tendenza dei micronuclei a distribuirsi regolarmente, dopo la loro divisione o più probabilmente durante questa, negli individui figli.

Dai dati della tabella si ricava inoltre che il 54,6% degli individui esaminati presentano ancora 2 micronuclei nel periodo intercinetico. Tali individui oltre ad essere presenti all'inizio dell'esperimento si possono formare anche durante le segregazioni irregolari di esemplari con un numero di micronuclei diverso da 2, ed essere esclusi. Dobbiamo poi citare il fatto che in organismi non troppo vecchi si ha sempre il ritorno ad una condizione normale circa i micronuclei ad ogni processo sessuale qualunque sia il numero di micronuclei, purchè diverso da zero, e presenti all'inizio del processo stesso. Questi reperti sembrano indicare una certa tendenza conservatrice, che possiamo chiamare anche omeostasi, agente verso il mantenimento od il ripristino di 2 micronuclei all'interno della popolazione e si contrappone all'azione del gene *am*.

Il numero dei micronuclei presenti in organismi in divisione è sempre pari; in 4 casi soltanto questi erano in numero dispari, ma ciò potrebbe essere dovuto al fatto che in individui ben nutriti non è sempre agevole individuarli, specie dopo la colorazione con orceina-acetica. Non si sono poi osservati fenomeni di picco o di degenerazione dei micronuclei stessi.

È stata esaminata anche la possibilità che in individui amacronucleati possa avvenire la divisione dei micronuclei. È già stato detto che gli amacronucleati muoiono entro un periodo di 40 ore dal momento della loro origine. In questo periodo di tempo i micronuclei potrebbero dividersi, dal momento che a 27° C. gli organismi normali si dividono ogni 5 ore circa. A tal uopo sono stati isolati contemporaneamente 74 individui amacronucleati a 27° C.: 35 sono stati fissati e colorati quando erano vecchi di 4-5 ore; 39 dopo 20 ore dal momento della loro formazione. I dati ricavati sono esposti nella tabella V. Da questa risulta che il

TABELLA V

Numero dei micronuclei in cellule amacronucleate, dopo 4-5 ore dalla loro formazione e dopo 15-20 ore.

| 4-5 ore | | 15-20 ore | |
|----------------------|----------|-----------------|----------|
| N° anim. Amacr. | N° micr. | N° anim. Amacr. | N° micr. |
| 17 | 2 | 20 | 2 |
| 5 | 1 | 10 | 1 |
| 7 | 3 | 4 | 3 |
| 3 | 4 | 3 | 4 |
| 2 | 5 | 1 | 6 |
| 1 | 7 | 1 | 8 |
| Tot. 35 | 89 | 39 | 88 |
| med. $2,54 \pm 0,44$ | | $2,25 \pm 0,45$ | |

numero medio di micronuclei presenti per individuo è superiore nel gruppo di amacronucleati vecchi di 4 ore rispetto a quello di 20 ore. Da un punto di vista statistico sembra non esservi alcuna differenza tra i due gruppi: il che significa che il numero dei micronuclei non è aumentato, cioè non vi è stata alcuna divisione di questi, negli amacronucleati più vecchi, entro il tempo considerato. Pur riconoscendo che il numero degli esemplari esaminati è basso, mi sembrerebbe di poter concludere che i micronuclei sono incapaci di dividersi in assenza di macronucleo.

3 - L'irregolare distribuzione dei 2 ma-anlagen ad un solo organismo figlio avviene durante la prima divisione successiva ad un processo sessuale; talvolta anche nella seconda divisione si osserva la mancanza di segregazione degli anlagen macronucleari, ma questa è ovviamente molto più rara. I dati relativi alla segregazione e mancanza di segregazione dei 2 ma-anlagen durante la prima divisione dopo autogamia sono riportati nella tabella VI. I 6 cloni da cui gli esemplari in scissione vennero prelevati sono stati isolati giornalmente per determinarne facilmente l'età in base al numero di divisioni; l'autogamia è stata indotta ogni 10 scissioni, mentre nella tabella i dati sono sommati per intervalli di 20 scissioni fra ogni autogamia. La tecnica usata è quella descritta precedentemente. Come si vede, c'è un aumento di segregazioni irregolari dei 2 ma-anlagen in relazione all'età del clone, come pure in relazione alla temperatura di allevamento.

TABELLA VI

distribuzione dei due ma-anlagen durante la prima divisione dopo autogamia in relazione all'età del clone ed alla temperatura di allevamento.

| Età in ° div. | Temperatura 19° C. | | | | Temperatura 27° C. | | | |
|------------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|-------------|--------------------|---------------------------|----------------------------|-------------|
| | N° anm. esamin. | Ma-anl. norm. dist. | Ma-anl. anorm. dist. | % anorm. | N° anm. esamin. | Ma-anl. norm. dist. | Ma-anl. anorm. dist. | % anorm. |
| 20 | 65 | 43 | 22 | 33,8 | 76 | 42 | 34 | 44,7 |
| 40 | 205 | 134 | 71 | 34,6 | 218 | 115 | 103 | 47,3 |
| 60 | 101 | 67 | 34 | 33,6 | 109 | 57 | 52 | 48,0 |
| 80 | 96 | 56 | 40 | 41,6 | 124 | 48 | 76 | 61,3 |

mento. Gli animali tenuti a 19° C. danno solo il 41% di individui con distribuzione irregolare, nell'intervallo tra 60 e 80 divisioni; mentre alla stessa età a 27° C. ha una percentuale del 61,3. Anche ad età intermedia c'è sempre una differenza significativa fra i due gruppi a vantaggio, per ciò che concerne la mancanza di segregazione, del gruppo mantenuto a 27° C.

Per una valutazione esatta dell'effetto della temperatura debbo dire che gli esemplari, coltivati normalmente a 27° C, venivano posti a 19° C. quando gli individui, colorati per controllare lo stato autogamico della coltura di prelievo, presentavano il macronucleo allo stadio di skein o già frammentato. Può darsi infatti che l'effetto della temperatura possa variare a seconda dello stadio di sviluppo nucleare dei Parameci al momento iniziale dell'esperimento. Circa questa possibilità non posso aggiungere altro perchè non ho compiuto gli esperimenti necessari.

4 - Le irregolarità a carico dell'apparato nucleare causate dal gene *am* durante la divisione del Paramecio dovrebbero, teoricamente, interessare equamente proter e l'opiste. Questa era anche l'opinione del SONNEBORN (1954) quando descrisse per la prima volta il fenotipo di un clone omozigote per *am*. Nell'indagine da me compiuta sono emersi fatti che dimostrano come il macronucleo e i 2 ma-anlagen rimangano o si portano, ad ogni divisione irregolare, in gran maggioranza nell'animale posteriore.

I dati relativi sono esposti nelle tabelle VII e VIII. Come si vede il 96-97% degli animali con divisione completamente irregolare presenta i 2 ma-anlagen o il macronucleo nell'opiste. Questo fatto non trova riscontro nei casi segnalati in letteratura di divisioni macronucleari irregolari indotti o no con agenti chimici, mediante formazioni di mostri (LLOYD 1947, 1949), o in animali normali (DILLER

1940; MIYAKE 1955). È possibile inoltre osservare già in vivo, mentre il processo di divisione procede, se il macronucleo rimarrà tutto o gran parte di esso nell'opiste. Questo facilita molto la selezione di organismi amacronucleati, o con poco macronucleo, nonchè quelli che rigenereranno il macronucleo da un frammento del vecchio dopo un processo sessuale (NOBILI 1960).

Nel caso di segregazione irregolare dei micronuclei il numero di individui che presentano più micronuclei nel proter è di 44 contro i 43 che ne hanno di più nell'opiste (vedi Tab. IV). Non vi è poi alcuna relazione fra distribuzione irregolare dei micronuclei e quella del macronucleo; il che indica una indipendenza completa dei due fenomeni pur essendo entrambi determinati dallo stesso gene

TABELLA VII

Distribuzione del macronucleo nel proter e nell'opiste durante la formazione di amacronucleati

| N° anm. in div. | Macr. nel Proter | % | Macr. nel- l'Opiste | % |
|--------------------|---------------------|------|------------------------|-------|
| 131 | 4 | 3,05 | 127 | 96,95 |

TABELLA VIII

Distribuzione dei due ma-anlagen nel proter e nell'opiste durante la prima divisione dopo autogamia.

| N° anm. in div. | 2 ma-anl. nel Proter | % | 2 ma-anl. nell'Opiste | % |
|--------------------|-------------------------|-----|--------------------------|------|
| 432 | 18 | 4,1 | 414 | 95,9 |

Va pure ricordato la irregolare distribuzione dei frammenti macronucleari alla prima divisione post-autogamica che si accompagna di solito ma non necessariamente, alla irregolare segregazione dei 2 ma-anlagen. Un maggior numero di frammenti, si trova infatti nell'individuo privo dell'anlagen macronucleare.

Da quanto detto risulta evidente l'azione multipla estrinsecata dal gene *ama* sull'apparato nucleare di *P. aurelia* durante i processi di divisione, senza apparentemente disturbare la regolare divisione del citosoma.

DISCUSSIONE

È opportuno ricordare anzitutto che la formazione di amacronucleati nei Ciliati può riscontrarsi in varie condizioni; anzitutto nei cosiddetti mostri — agglomerati irregolari di più animali — i quali di solito presentano un macronucleo

entrale molto grosso. Da tali « mostri » si distaccano a volte delle porzioni citomiche più o meno regolari, simili a gemme, prive di macronucleo, che poi conducono vita indipendente per un certo tempo fino alla loro morte. Altri amacronucleati si possono ottenere sperimentalmente mediante tagli di parti del citoma prive di nucleo, che successivamente regolarizzano la loro forma fino ad apparire del tutto normali. Non voglio discutere l'abbondante letteratura concernente la generazione di tali amocronucleati perchè non rientrano nel caso di cui in esame.

DILLER (1940) osservò formazioni di amacronucleati in individui normali *Paramecium caudatum* e MIYAKE (1955), nella stessa specie, riuscì ad ottenerne sperimentalmente mediante l'introduzione di urea nel liquido colturale. Gli AA. eccitati non parlano tuttavia di alcuna differenza fra il proter e l'opiste; da ciò deduce che il macronucleo può rimanere tutto, con eguale frequenza, sia nell'uno che nell'altro. Il trattamento con urea dà luogo inoltre ad una struttura macronucleare allungata, fino a diventare filiforme con estremità appuntite, e talvolta a frammentazioni; oppure, a più alta concentrazione, inibisce l'allungamento del macronucleo. Nel caso da me esaminato, il macronucleo si presenta nel genere con una struttura tipicamente normale, almeno in individui non troppo vecchi. Come già SONNEBORN aveva osservato, il piano di scissione del macronucleo si trova allo stesso livello di quello citosomico come di norma, anche quando una piccola porzione di questo rimane nell'individuo anteriore; ma un piano di divisione è presente spesso nello stesso punto mediano dove il macronucleo di solito si divide, anche quando questo rimane tutto nell'opiste. Ciò è indice di una determinazione intramacronucleare del proprio piano di scissione, e nello stesso tempo indica che il gene *am* non inibisce tale determinazione, per cui il formarsi di amacronucleati è dovuto ad altre cause e non al mancato allungarsi del macronucleo con la sua successiva divisione mediana (Fig. 1). Solo in esemplari abbastanza vecchi, o dopo ripetute divisioni irregolari, il macronucleo assume una forma globosa senza allungamento di sorta, sì che la sua scissione sembra completamente inibita (Fig. 2). Ma anche in questo caso non si spiega perchè il macronucleo, come del resto i 2 ma-anlagen, rimangono di preferenza nell'individuo posteriore, dal momento che all'inizio della scissione entrambi occupano posizioni normali all'interno del citosoma. MIYAKE (1955) e DILLER (1940) come del resto altri di cui parleremo appresso, pensano che l'urea e forse altre sostanze chimiche, nonchè parassiti citoplasmatici, possano causare una fluidificazione citosomica, che a sua volta faciliterebbe o sarebbe responsabile della irregolare distribuzione dei vari elementi dell'apparato nucleare. Anche ammettendo che il gene *am* agisca nello stesso senso, conserva tuttavia una propria specificità di azione a causa del passaggio preferenziale del macronucleo e dei 2 ma-anlagen nell'opiste; il che non si spiega con una diminuzione della viscosità del citosoma.

Passando a considerare la variazione di penetranza del gene *am* in relazione

all'età del clone, va notato che in *Paramecium aurelia* si può avere formazione di amacronucleati, anche se in numero molto limitato, in cloni abbastanza vecchi. Ciò dimostra l'esistenza in questa specie di una certa tendenza a dividersi irregolarmente dopo una data età. Va poi sottolineato il fatto che divisioni irregolari sembrano accelerare il processo dell'invecchiamento di un clone, come è dimostrato dai cloni omozigoti per *am* che hanno in media una lunghezza della vita

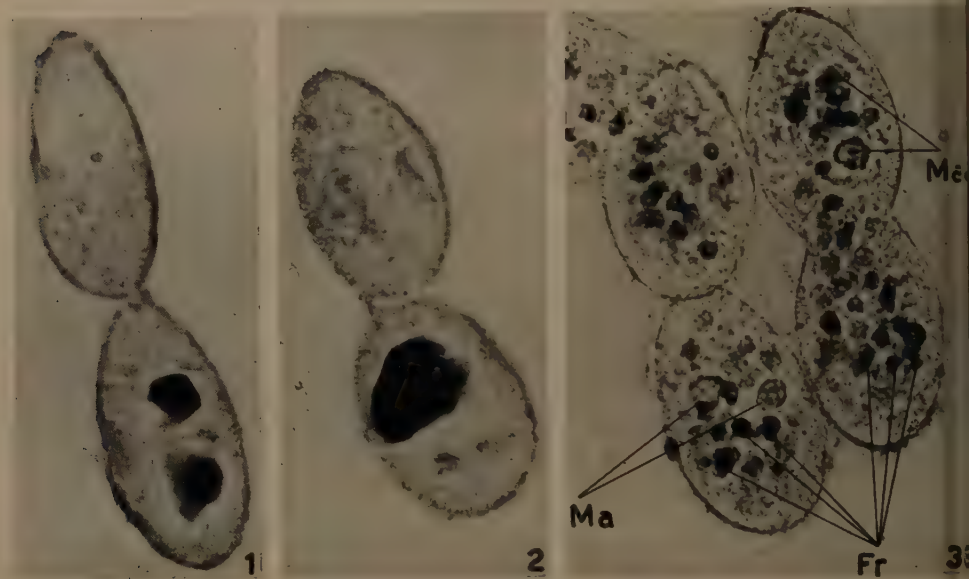


Fig. 1. — Animale in divisione vegetativa avanzata col macronucleo diviso che rimane tutto nell'individuo posteriore.

Fig. 2. — Animale in divisione vegetativa avanzata con macronucleo di forma irregolare indiviso, e che rimane nell'individuo posteriore.

Fig. 3. — Due animali durante la prima divisione dopo autogamia; entrambi presentano una segregazione irregolare dei 2 abbozzi del macronucleo (*ma-anlagen*). Nell'animale di sinistra i 2 *ma-anlagen* si trovano nell'individuo figlio posteriore, in quello di destra giacciono entrambi nell'individuo anteriore. Frammenti del vecchio macronucleo dispersi nel citosoma di tutti e quattro gli individui figli. (Ma = abbozzi del macronucleo; Fr = frammenti del vecchio macronucleo).

ridotta circa a metà rispetto a cloni normali: 100-140 divisioni anziché 250-300. Appare quindi logico supporre che, con l'accelerazione dei processi di invecchiamento, si sovrapponga all'azione intrinseca del gene *am* la tendenza di cui sopra a produrre amacronucleati; il che potrebbe contribuire, in parte almeno, all'incremento della penetranza osservata. In individui vecchi normali si nota ancora una ripartizione irregolare del macronucleo, analogamente a ciò che si verifica in cloni omozigoti per *am* anche quando sono giovani. Tutto ciò porta a concludere che il gene *am* interferisce con i meccanismi responsabili dell'invecchiamento

per lo meno ha un'azione simile. Tale azione potrebbe identificarsi con l'alterazione del rapporto nucleo-citoplasma (N/C) che secondo HERTWIG (1903 *a, b*) avrebbe responsabile dell'invecchiamento. Tuttavia, selezionando fra cloni *am* individui che presentano questo rapporto anormale, ho visto che il loro ciclo vitale non è diverso da quello di individui normali dello stesso ceppo. Pertanto un C variato potrebbe essere un effetto dell'invecchiamento anzichè una causa; quindi del gene *am*, ma non il componente responsabile dell'invecchiamento precoce causato da tale gene.

C'è poi il problema della variabile penetranza riscontrata nei diversi cloni diati. Accanto a cloni in cui questa raggiunge il limite teorico massimo, ve ne sono altri in cui la formazione di amacronucleati inizia dopo 30 divisioni dall'autogamia, e in cui la penetranza rimane poi sempre molto bassa anche se tende a salire con l'età. Scartando la possibilità di un « lag » citoplasmatico perchè troppo lungo, si può spiegare questa variabilità come dovuta a presumibili modificatori della penetranza presenti in alcuni genotipi, o più semplicemente ad una diversa azione del gene *am* a seconda del genotipo in cui si trova. Per chiarire questo aspetto del problema sono tuttavia necessarie ulteriori ricerche.

Circa l'effetto della temperatura sulla mancanza di segregazione dei macronuclei nella prima divisione post-autogamica, dirò che i risultati ottenuti corrispondono a quelli attesi. Il SONNEBORN (1940, 1950) aveva messo in evidenza che un breve soggiorno ad una temperatura di 34° C. di animali in autogamia, lesse il potere di provocare una segregazione irregolare dei macronuclei, tanto che questo trattamento è ora un metodo di routine per ottenere rigenerazione del macronucleo in stocks normali. Anche se la temperatura usata nel mio esperimento non è stata così elevata, mi sembra ovvio pensare che il suo effetto sia maggiore a 27° C. che non a 19° C., e che inoltre agisca nella stessa direzione di quella a 34° C. Se ciò è esatto, l'effetto della temperatura verrebbe a rinforzare l'azione del gene *am*, aumentandone quindi la penetranza come è stato riscontrato.

Circa i micronuclei, va subito detto che esiste nei Parameci appartenenti al ceppo *aurelia*, cioè con micronuclei di tipo vescicolare, la tendenza a presentarne numero variabile (vedi Tab. 3, pag. 87, in WICHTERMAN 1953). Tuttavia *P. aurelia* si distingue, a parte altre caratteristiche, per la costanza numerica dei micronuclei, sempre in numero di 2. Le varie condizioni micronucleari riportate nella tabella IV traggono indubbiamente la loro origine dalla irregolare distribuzione dei micronuclei che si manifesta nel gruppo a 2 micronuclei, e tutte sono dovute all'azione del gene *am*. Non essendoci picnosi o degenerazione dei micronuclei, per lo meno queste mai furono osservate, la presenza di un corredo normale micronucleare è solamente dovuta alla loro distribuzione irregolare durante la separazione anafasica. Di ciò è conferma anche il loro tipo di anormalità. Tenendo conto che le divisioni mitotiche in *P. aurelia* sono di solito sinaptonemali, sicchè al loro termine 2 micronuclei sono presenti a ciascuna estremità

dell'animale in divisione, mentre negli esemplari omozigoti per *am*, pur avendo sempre divisioni sincrone, la distribuzione dei micronuclei varia, se ne deduce che tale gene agisce sul filamento (fuso endonucleare) che connette i nuclei anafasici impedendone l'allungamento, o, come alternativa, che agisce sul citosoma, il quale a sua volta renderebbe in qualche modo irregolare parte del processo mitotico micronucleare. Questa ultima ipotesi è stata proposta per spiegare le variazioni nel numero di micronuclei osservate in varie specie di *Paramecium* di diversi AA. Fra questi, WOODRUFF (1931), SCHWARTZ (1934), DILLER (1940), WICKTERMAN (1946, 1954) e MIYAKE (1956, 1957) considerano l'estrema fluidità del citosoma come condizione responsabile dei fenomeni osservati. Mi sembra opportuno osservare che un abbassamento della viscosità citoplasmatica dovrebbe favorire lo spostamento dei nuclei anafasici all'interno del citosoma, a meno che tale riduzione provochi anche un orientamento della loro migrazione lungo l'asse trasversale od obliquamente, anzichè lungo l'asse longitudinale dell'animale come di norma avviene. Ma niente ci vieta di pensare che questo diverso orientamento sia intrinseco alle fibre connettenti i nuclei anafasici e del tutto indipendente da ogni situazione presente nel citosoma, o che invece di un diverso orientamento si tratti di una riduzione della lunghezza delle fibre internucleari sì da impedire una migrazione dei nuclei alle due estremità dell'individuo. Inoltre può darsi che l'azione dell'ambiente nel produrre fenocopie del mutante *am* sia diversa da quella del gene stesso. Dall'esame citologico risulta che i nuclei telofasici, nella loro caratteristica forma a paracadute, sono orientati normalmente secondo l'asse longitudinale dell'animale; il che favorirebbe l'interpretazione secondo la prima ipotesi.

Va infine ricordato che organismi amacronucleati sono incapaci di entrare in autogamia, di presentare vera coniugazione (SONNEBORN 1954) e di avere mitosi micronucleari. Tutto ciò denota mancanza di attività biologica a livello dei micronuclei per ciò che concerne i processi fondamentali della vita vegetativa e sessuale. Il macronucleo sembra pertanto essere il vero centro vitale in questi organismi.

BIBLIOGRAFIA

- DILLER W. F., 1940. — *Nuclear variation in Paramecium caudatum*. J. Morphol., **66**: 605-633.
 DIPPEL R. V., 1955. — *Some cytological aspects of aging in variety 4 of Paramecium aurelium*. J. Protozool., **2** (Suppl.), (abstract).
 HERTWIG R., 1903. — *Ueber Korrelation von Zell - und Kerngrösse und ihre Bedeutung für die geschlechtliche Differenzierung und die teilung der Zelle*. Biol. Centr., **23**: 49-62, 108-119.
 LLOYD L., 1947. — *Unco-ordinated growth in Paramecium induced by a Gammaexane*. Nature, **159**: 135.
 —, 1949. — *Induced and spontaneous abnormalities in Paramecium*. Proc. Leeds Phil. Lit. Soc. Sci. Sect., **5**: 140-154.

- TECHISON N. A., 1955. — Evidence against micronuclear mutations as the sole basis for death at fertilization in aged, and in the progeny of ultra-violet irradiated, *Paramecium aurelia*. *Genetics*, **40**: 61-75.
- YAKE A., 1955. — The effect of urea on binary fission in *Paramecium caudatum*. *J. Inst. of Polytechn.*, Osaka City Univ., Ser. D., **6**: 43-57.
- , 1956. — Artificially induced micronuclear variation in *Paramecium caudatum*. *J. Inst. of Polytechn.*, Osaka City Univ., Ser. D. **7**: 147-161.
- , 1957. — On the stability of bimicronucleate condition in *Paramecium caudatum*. *J. Inst. of Polytechn.*, Osaka City Univ., Ser. D., **8**: 11-19.
- OBILI R., 1959. — The effects of aging and temperature on the expression of the gene « *am* » in variety 4, stock 51, of *Paramecium aurelia*. *J. Protozool.*, **6** (Suppl.): 29.
- , 1960. — The effect of macronuclear regeneration on vitality in *Paramecium aurelia* syngen 4. *J. Protozool.*, **7** (Suppl.): 15.
- NNEBORN T. M., 1938. — The delayed occurrence and total omission of endomixis in selected lines of *Paramecium aurelia*. *Biol. Bull.*, **74**: 76-82.
- , 1940. — The relation of macronuclear regeneration in *Paramecium aurelia* to macronuclear structure, amitosis and genetic determination. *Anat. Rec.*, **81**: 66-67.
- , 1950. — Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. *J. Exper. Zool.*, **113**: 87-147.
- , 1954. — Gene-controlled, aberrant nuclear behavior in *Paramecium aurelia*. *Microb. Genet. Bull.*, **11**: 24-25.
- CHWARTZ V., 1934. — Versuche über Regeneration und Kerndimorphismus der Ciliaten. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Math-physik.* VI, n.F. **1**: 143-155.
- ICHTERMAN R., 1946. — Unstable micronuclear behavior in an unusual race of *Paramecium*. *Anat. Rec.*, **94**: 94.
- , 1953. — *The biology of Paramecium*. Blackiston Company Inc., New York, 1-527.
- , 1954. — The common occurrence of micronuclear variation during binary fission in an unusual race of *Paramecium caudatum*. *J. Protozool.*, **1**: 54-59.
- OODRUFF L. I., 1931. — Micronuclear variation in *Paramecium bursaria*. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **74**: 537-545.

SUMMARY

The penetrance of the gene *am* in relation to the clone age and culture temperature has been examined. The action of such gene on the nuclear apparatus of *Paramecium* has been accurately followed during both vegetative and sexual reproduction. The amacronucleate formation increases with the clone age from an average of 10% in the first 15 fissions since autogamy, to 34% or more after 80 fissions.

As to the micronuclei there is a great variability since along with amicronucleate specimens, individuals with as many as 11 micronuclei are formed. Even in this case the percentage of abnormal animals seems to be correlated to the clone age.

In the first fission after autogamy both ma-anlagen migrate to one daughter cell in a variable percentage that increases at the increase of clone age and culture temperature. Moreover it has been shown that in 97% of cases of markedly unequal fissions, it is the posterior daughter cell which receives the whole macronucleus or both macronuclear anlagen. Such results have been discussed with respect to the phenocopies of the gene *am* known in the literature in order to clarify the action of the gene.

RIASSUNTO

È stata esaminata la variazione della penetranza del gene *am* rispetto all'età dei cloni e alla temperatura di allevamento. Si è accuratamente seguita l'azione di tale gene sull'apparato nucleare durante la riproduzione vegetativa e sessuale. La formazione dell'amacronucleo aumenta con l'età del clone, passando da una media del 10% nelle prime 15 divisioni dopo l'autogamia, al 34% o più dopo 80 divisioni.

rato nucleare del Paramecio sia durante la riproduzione vegetativa che durante la riproduzione sessuata. È stato notato che la percentuale di amacronucleati aumenta con l'aumentare dell'età passando dal 10% in media nelle prime 15 divisioni, al 34% o più dopo 80 divisioni. Per quanto concerne i micronuclei si è osservato una variabilità che porta alla formazione di amicronucleati e di individui con 11 micronuclei. Anche in questo caso la percentuale di anormali sembra essere in relazione all'età. Durante la riproduzione sessuata si è osservata una migrazione dei 2 abbozzi del macronucleo ad un solo individuo figlio in percentuale variabile che tende a crescere con l'età del clone e con l'aumentare della temperatura di allevamento. Inoltre è stata messa in evidenza una ripartizione irregolare preferenziale dei 2 macronuclei anlagen e del macronucleo che avviene nel 97% dei casi a vantaggio dell'individuo posteriore.

Tali risultati sono stati discussi in relazione a fenocopie del gene *am* note in letteratura per cercare di chiarire il meccanismo d'azione del gene stesso.

SPONTANEOUS ASYNAPSIS IN *TRADESCANTIA*

CANIO G. VOSA

Botany School, University of Oxford, Oxford, Great Britain

Received: 12th November 1960

The object of this study is a near triploid plant of *Tradescantia* which chromosome complement is 17 A chromosomes, one telocentric chromosome and three four B chromosomes; one of the A chromosomes has a small secondary constriction.

The size of the B chromosomes is about $\frac{1}{8}$ of the A's. Such B's are known both $2x$ and $4x$ species of *Tradescantia* and are probably old established chromosomes.

They betray their origin by varying in number at mitosis in root tips (MARLINGTON 1956). Their faulty centromeres are too weak for regular movements in somatic divisions.

The telocentric chromosome is as long as the short arm of the biggest A chromosome.

Thus the complement is $3x - \frac{1}{2} A + 3-4 B's$. It is the first unbalanced *Tradescantia* on record, the results probably of a cross between $2x$ and $4x$ species, misdivision having occurred in an A chromosome of the $4x$ parent.

The method used is a modified stain fixing technic using aceto-orcein (LAOUR 1941) and it is very useful in determining the number and the direction of pairing of the meiotic chromosomes.

Two exceptionally asynaptic cells were found in different anthers on the same flower. The material was collected from the plant growing in the open on the 14th June 1959 and although the mean temperature was rather high, its interference may be ruled out because the rest of the cells were pairing normally.

In fig. 1 the chromosomes lie at random and their centromeres show no evidence of co-orientation; fig. 2 shows a synaptic cell in which there are three univalent, three bivalent and three trivalent A chromosomes. There are three B chromosomes of which two are forming a bivalent.

We may consider the two situations asynapsis and supersynapsis which has been found in some cells, as the opposite ends of a broad variance curve showing the control of meiosis and connected with the unbalance of the plant.

The telocentric chromosome, which is not always stable owing to the

weakness of its centromere having been observed off plate at mitosis in root-tips may interfere with pairing.

The condition of supersynapsis in this plant is remarkable giving rise to pairing between non homologous chromosomes. It could be suggested here that

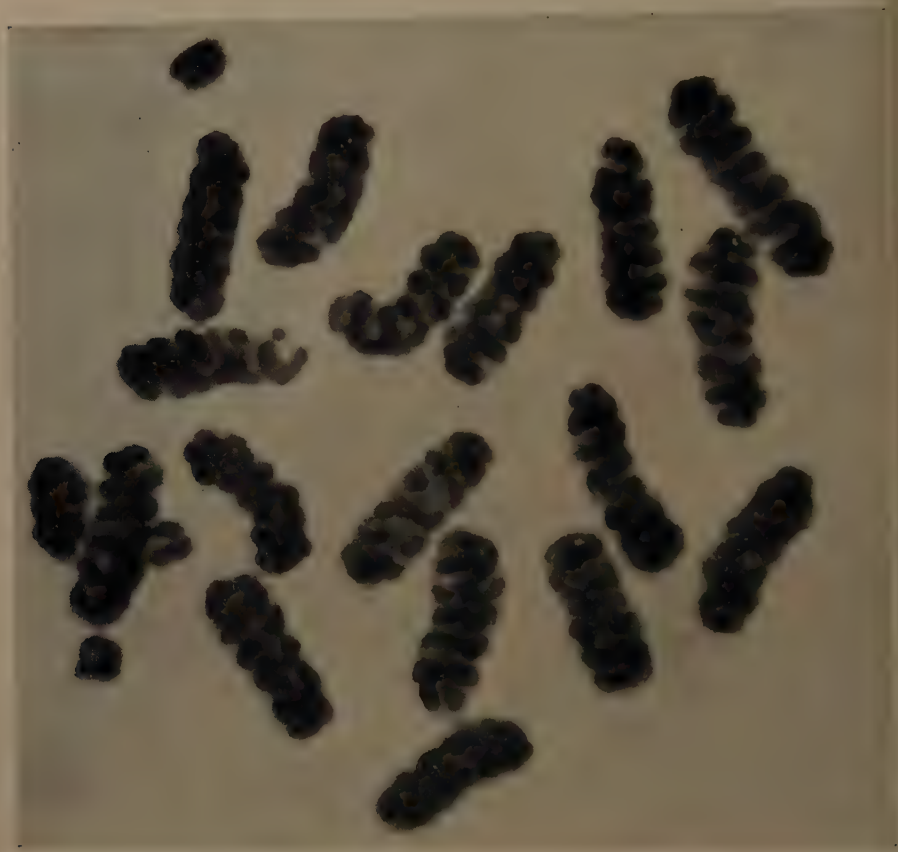


Fig. 1. — Pollen mother cell at metaphase I of meiosis showing condition of complete asynapsis; $\times 2,800$.

at least in the *Tradescantia* of the *Virginiana* group, a tiny part at the end of each chromosome shows trace of homology. The evidence of a ring of three chromosomes found once and the occurrence of chains of even six chromosomes could be a trend toward this conclusion. Also the existence of chromosomes pairing on themselves could be interpreted in this sense.

The asynaptic condition happening in normal plants could give rise to unreduced pollen grains. As SAX suggested, in his experiment, in 1937, the

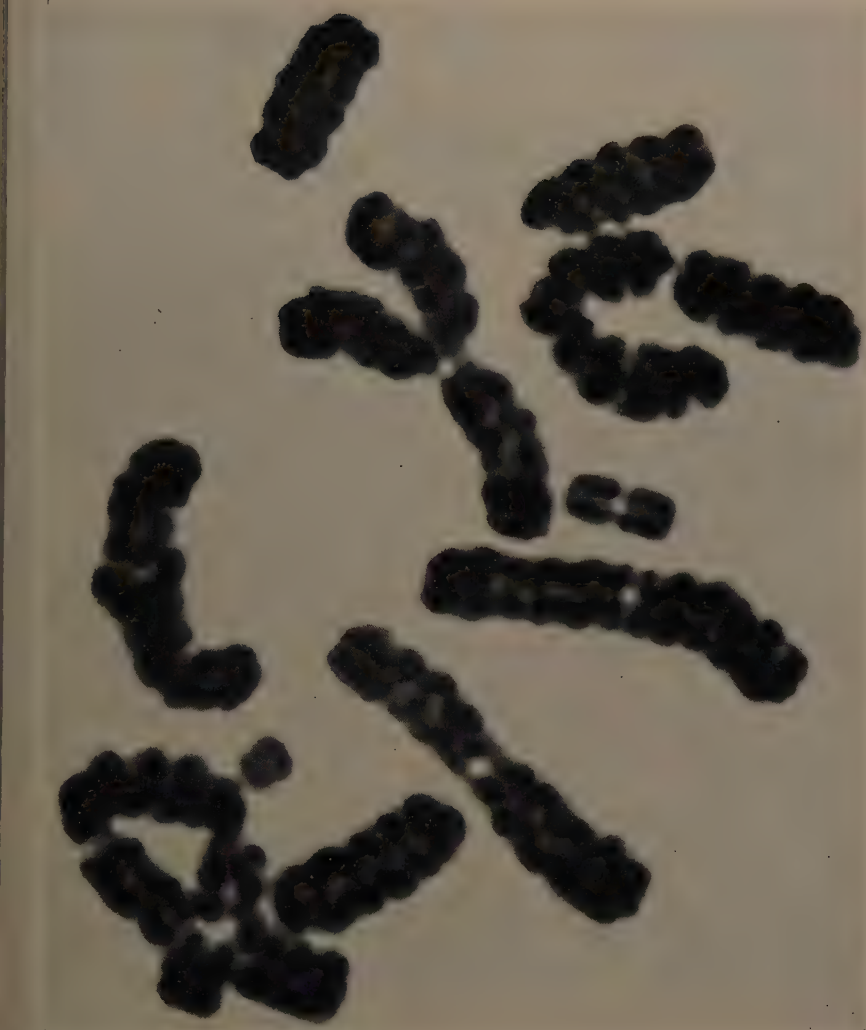


Fig. 2. — Pollen mother cell at metaphase I of meiosis with three univalents, three bivalents and three trivalents chromosomes of type A, two B chromosomes are paired, the third is univalent; $\times 2,800$.

Asynaptic cells have no evidence of spindle mechanism and may go to interphase with a single nucleus that will divide equationally to form diads.

Thus spontaneous asynapsis could be, sometimes, responsible in producing hexo-triploidy in self compatible plants.

Induced asynapsis under controlled conditions could be used as a new method in creating polyploids.

REFERENCES

- DARLINGTON C. D., 1956. — *Chromosome botany*. George Allen & Unwin Ltd., London.
LA COUR L., 1941. — *Acetic-orcein*. Stain Techn., **16**: 169-174.
SAX K., 1937. — *Effect of variation in temperature on nuclear and cell division in Tradescantia virginiana*. Amer. Jour. Bot., **24**: 218-224.

RIASSUNTO

Oggetto di questa nota è l'anormale comportamento meiotico di una pianta di *Tradescantia virginiana* il cui cariotipo comprende 17 cromosomi di tipo A, un cromosoma telocentrico e un certo numero di cromosomi B.

Il numero di cromosomi B presenti nel cariotipo è variabile ed oscilla fra tre e quattro; i loro centromeri, che sono terminali, risultano troppo deboli per regolari divisioni somatiche.

Due cellule madri del polline sono state osservate in condizioni di completa asynapsis mentre le altre cellule nella medesima antera non presentavano irregolarità rilevanti.

Le condizioni di asynapsis e la supersynapsis, che è stata osservata in alcune cellule, sono considerate come i due estremi di una situazione di squilibrio che è connessa con la presenza del cromosoma telocentrico, il quale mostra anche nelle divisioni somatiche comportamento anormale.

La supersynapsis suggerisce l'esistenza di una certa affinità fra le estremità di cromosomi non omologhi.

L'asynapsis indotta razionalmente può essere usata come un nuovo metodo per la produzione di poliploidi.

ABSENCE OF CHIASMATA AND FORMATION OF A COMPLEX CHROMOSOMAL BODY IN THE SPERMATOGENESIS OF THE SCORPION *PALAMNAEUS LONGIMANUS*

M. D. L. SRIVASTAVA and UMA AGRAWAL

Zoology Department, Allahabad University, Allahabad, India.

Received: 7th January 1961

Spermatogenesis in scorpions is characterised by certain features of outstanding interest. PIZA (1939, 1940, 1943*a* and *b*, 1944, 1946, 1947*a*, *b* and *c*, 1948*a*, and *c*, 1949, 1950*a* and *b*) has shown, in several Brazilian species, the occurrence of reciprocal translocations, sometimes several in the same individual, leading to the formation of complex chromosomal figures at the first metaphase. These bodies have been likened (WHITE 1954) to the meiotic chromosomal elements of *Oenothera*, which is known to be a complex heterozygote. There is an important difference, however, between the chromosomal elements of these scorpions and those of the evening primrose: whereas in the latter the chromosomes of the complex bodies are chiasmally connected, in the former, chiasma-formation is completely abolished (PIZA). BRIEGER and GRANER (1943) claim that their material does furnish some evidence indicating the existence of chiasmata, but that evidence is not quite convincing.

Another noteworthy feature of the chromosome complement of the Brazilian scorpions studied by PIZA is the inconstancy of the karyotype, the chromosome number of the members of the same species varying from locality to locality. This has been taken to indicate the prevalence of fusion and fragmentation.

It has been contended by BRIEGER and KERR (1949) that the scorpion chromosomes are polycentric, although PIZA believes, on the basis of the evidence of his own material, that they are bicentric.

More recently SHARMA and JONEJA (1959) have reported chain-formation of chromosomes at the first metaphase in two species of *Buthus*, which they ascribe to translocations. They further report that in the spermatogenesis of these scorpions there is no diplotene and no diakinesis and the bivalents are not chiasmally connected. Absence of chiasmata is reported in several species by SOKOLOW (1913) and SATO (1936).

Knowledge regarding the sex chromosomes of scorpions is most unsatisfactory. All that one can say with certainty is that the male scorpions investigated so far are not heterogametic (SOKOLOW 1913; SATO 1936; SHARMA and JONEJA 1959). Conditions in the females in this respect are unknown.

Observation of meiosis in the scorpion *Palamnaeus longimanus* has yielded valuable evidence bearing on some of the questions mentioned above, and so a somewhat detailed report seems justified.

MATERIAL AND METHODS

Specimens of *Palamnaeus longimanus* were obtained from the fields, groves and gardens of the district Allahabad. No attempt was made to obtain specimens from other areas, although that might be useful in determining whether fusion and fragmentation heterozygosity prevails in this species as it does in the Brazilian species studied by PIZA. Specimens were killed soon after being brought to the laboratory, but a few were sacrificed after a stay of varying duration in the laboratory. As fixatives were employed Bouin-Allen and Sanfelice and staining was done according to the method of Feulgen and of Newton (gentian violet) and with iron-haematoxylin. Diagrams were made with the help of a camera lucida and the photomicrographs were taken with Leitz Panphot, from Sanfelice gentian violet preparations.

OBSERVATIONS

Spermatogonial and oogonial mitoses. — Quite a large number of spermatogonial and oogonial metaphase plates are available for study. Most frequently, the chromosomes number 64 (Fig. 1), both at the spermatogonial and the oogonial metaphase. Fewer chromosomes, 63, 62 or rarely even 60, indeed are counted on some of the plates, but this might be easily due to overlapping, considering the large number of chromosomes crowded on a proportionately small plate. Neither at the spermatogonial nor at the oogonial metaphase does any chromosome betray any sign of heterochromatization, and so it is not possible to pick out the sex chromosomes that way. A comparison of the oogonial and spermatogonial chromosomal elements is rendered exceedingly difficult because of the overcrowding of the metaphase plate with chromosomes. Also, of the numerous oogonial and female somatic metaphase plates, not one is good enough for detailed and accurate study. However, there are indications that the male is the heterogametic sex (Fig. 1) and that the sex-determining chromosome mechanism is XY (♂) and XX (♀). The chromosome complement according to this scheme which is put forward tentatively only, is:

$$30 \text{ AA} + \text{XY} \quad (\text{♂})$$

$$30 \text{ AA} + \text{XX} \quad (\text{♀})$$

The largest element in the spermatogonial chromosome complement is undoubtedly a sex-chromosome, as it is without a mate; the other sex-chromosome is, however, difficult to spot, although it must be one of the next largest chromo-

mes. A few chromosomes bear a sharp constriction and a small arm, which shows that they are monocentric. Some are gently flexed, which indicates no evidence regarding the presence of the centromere. Most appear acrocentric.

Meiosis. — At leptotene, the chromosomes are fine, beaded threads, the chromomeres staining fairly conspicuously, in contrast to the faintly-stained interchromomeric fibrillae. Besides these fine threads, the nucleus contains two highly condensed and deeply stained bodies, which exhibit a distinct difference in size (Fig. 2). These bodies are taken to be the heteropycnotic X- and Y- chromosomes.

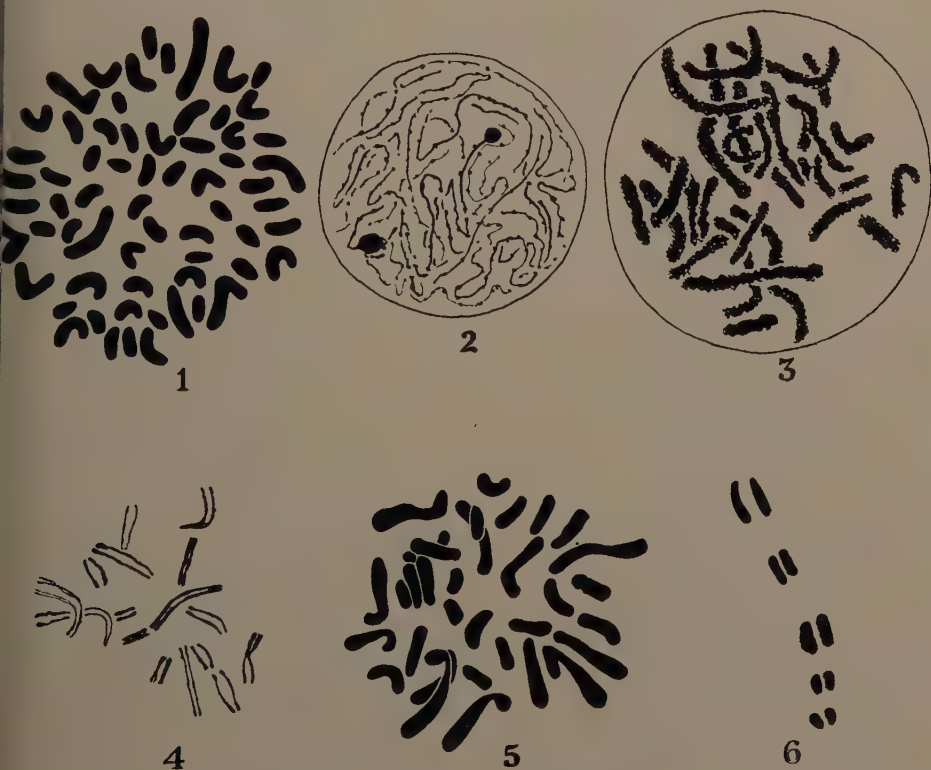


Fig. 1. — Spermatogonial metaphase, showing 64 chromosomes - 31 pairs of autosomes and the XY pair. The separate identities of X and Y have not been established.

Fig. 2. — Leptotene nucleus containing fine, beaded chromosomes and heterochromatic X and Y chromosomes.

Fig. 3. — Late pachytene nucleus, containing 32 bivalents.

Fig. 4. — A few diplotene bivalents, most of them clearly devoid of chiasmata.

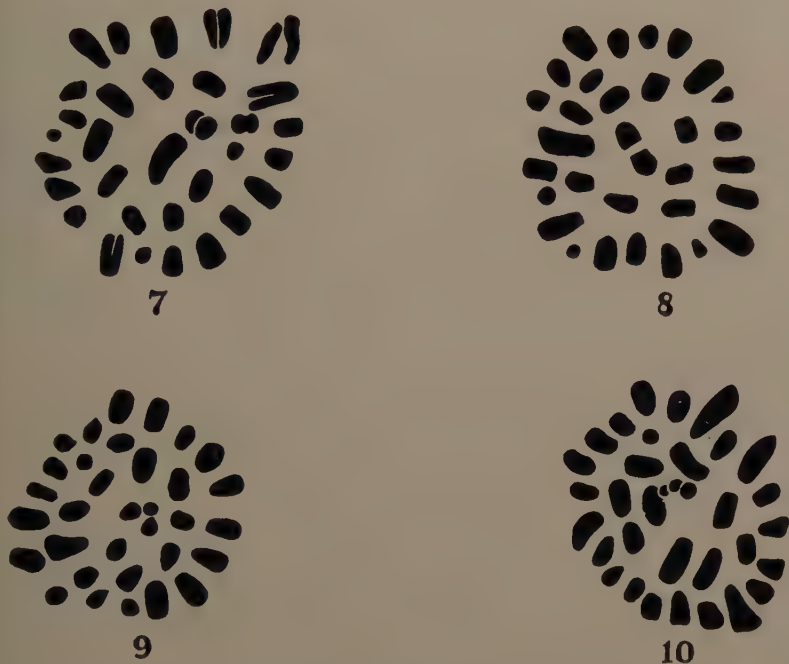
Fig. 5. — Late diakinesis chromosomal bodies of a nucleus numbering 33-31 bivalents and univalents. It is not possible to identify the univalents with certainty.

Fig. 6. — Five bivalents at the first metaphase, in side view. The bivalents are devoid of chiasmata.

The drawings have a magnification of $2500 \times$ approximately.

mosome. No other chromosome or chromosome segment shows the least degree of heterochromatization. Sometimes the nucleus contains a single, comparatively big, heteropycnotic element, and it can readily be inferred that this body is a compound one, arising from the mutual adhesion of the X- and Y- chromosomes. The mere fact that the leptotene nucleus contains heteropycnotic elements, do render it highly probable that this scorpion does possess differentiated sex-chromosomes. The onset and progress of pairing at zygotene is difficult to make out, both because of the overcrowding in the nuclear chamber and the rapidity of the process as indicated by the fact that there is always a far larger number of leptotene and pachytene nuclei than zygotene ones. However, synapsis is complete in every case, and, in a large proportion of full pachytene nuclei, the haploid number of chromosomal bodies, namely 32, can be counted fairly accurately (Fig. 3). The late pachytene chromosomes are distinctly smaller than the leptotene threads and there is no doubt that a good deal of spiral condensation of chromosomes takes place during the pachytene period. A rather curious feature of the pachytene is the total disappearance of the heterochromatization of the sex-chromosomes, so prominent during leptotene. The pachytene nucleus contains 32 bivalents and one of these must be the X-Y bivalent, but as to which particular bivalent is, there is hardly any indication. Probably it is the longest bivalent. SHARMA and JONEJA (1959) report that diplotene and diakinesis stages do not occur in the spermatogenesis of the species of *Buthus* that they have studied. In *Palamnaeus*, however, these stages are conspicuous. The most noteworthy feature of the diplotene bivalents is the total absence of chiasmata (Fig. 4). Each bivalent consists of two threads, arranged parallel to each other, but without coming in touch. Although each bivalent seemingly consists of two threads only, occasionally a bivalent may be noticed which shows all the four chromatids of which it is composed (Fig. 4). In some bivalents the overlapping of the paired homologues may render it impossible to determine whether chiasmata are present or not, but in the majority of the bivalents there is no ground for doubt at all. In these, the paired homologues do not touch each other at any point and so there is no question of the existence of a chiasma. It is obvious that such chromosomal figures in which two chromosomes remain disposed parallel to each other, without coming in touch at any position and without falling apart from each other, must represent a state of equilibrium between two forces acting in opposite directions: one force tends to push the chromosomes towards each other, the other force tends to push them away from each other. Probably these forces emanate from the chromosomes themselves. The late diplotene or early diakinesis does not bring in any particular change (Fig. 12). As before, each bivalent seems to consist of two strands disposed parallel to each other without touching. Some bivalents are more condensed than the rest at this stage and the constituent homologues cannot be easily made out. One such bivalent may be

sex-bivalent, but as there are usually more than one such bivalent, the sex bivalent cannot be definitely picked out. At late diakinesis (Fig. 5) the bivalents are considerably more condensed than at the previous stages and smaller, and, of course, the constituent threads composing each cannot be made out. Some of



7. — First metaphase, polar view, showing 32 bivalents. A few bivalents show partial complete separation of the partner chromosomes.

8. — First metaphase, showing 32 bivalents.

9. — First metaphase, showing 33 chromosomal bodies, 31 bivalents and 2 univalents, identity of the univalents not being established.

10. — First metaphase, showing 34 chromosomal bodies of which 30 are bivalents and 4 univalents. Probably the smallest 4 elements are the univalents.

The drawings have a magnification of $2500 \times$ approximately.

bivalents are J-shaped and the rest are rod-shaped, indicating the presence of the centromere near one end of the chromosome or a short distance away from it. There are very few metacentric elements. At the first metaphase, the bivalents occupy the entire equatorial plate. The largest bivalents, however, are nearly always confined to the periphery, and the smallest elements, with rare exception, to the interior (Figs. 7-10). In polar view each bivalent appears to be solid and homogeneous, but in side-view it is always observed that although the two partner chromosomes in a bivalent remain close and parallel to each other, they

never come in direct contact (Figs. 6 and 13). That is to say, the condition observed at diplotene persists unchanged down to the end of the first metaphase: this indicates that the chromosomes are held together by the simultaneous operation of special forces, possibly of mutual attraction and repulsion, and not by chiasmata. There are two other noteworthy features of the first metaphase chromosomal bodies, which are causally connected. These are: (1) variation in the number of the chromosomal bodies, and (2) occurrence of a complex chromosomal body. The variation in number arises from the simple fact that the homologous partner chromosomes of a bivalent sometimes become dissociated. If only one bivalent is resolved into two separate homologous chromosomes, there occur 33 chromosomal bodies (31 bivalents and 2 univalents) at the first metaphase: if two bivalents are resolved into four separate chromosomes, 34 chromosomal bodies (32 bivalents and 4 univalents) come to exist at the first metaphase. More than 33 elements are never observed in any spermatocyte at the first metaphase, which means that more than two bivalents never break up into their constituents simultaneously. In a proportion of the spermatocytes of the same individual in which 32-34 chromosomal bodies are counted at the first metaphase, there occur 30 bivalents and a complex figure consisting of four chromosomes (Figs. 11, 12 and 19). The formation of this complex figure indicates the presence of reciprocal translocations between two non-homologous chromosomes: that is to say, the complex body can be assumed to have AB-BC-CD-DA constitution. Although the individuals in which this first metaphase complex body is observed must be heterozygous for this chromosome-structure change, only a few spermatocytes actually possess this complex body. It must be assumed that in a large proportion of spermatocytes the four chromosomes involved, namely, AB, BC, CD and DA, pair to form two bivalents, AB pairing with AD or BC, and CD pairing with CD or AD. No complex figures have been observed so far at pachytene, diplotene or diakinesis, but a closer scrutiny will probably reveal the existence of such bodies. It is probable that the variation in the number of chromosomal bodies noticed at the first metaphase is due to the behaviour of these four chromosomes, which form either a quadrivalent, two bivalents, one bivalent and two univalents, or four univalents, causing thereby the appearance of 31, 32, 33 or 34 chromosomal

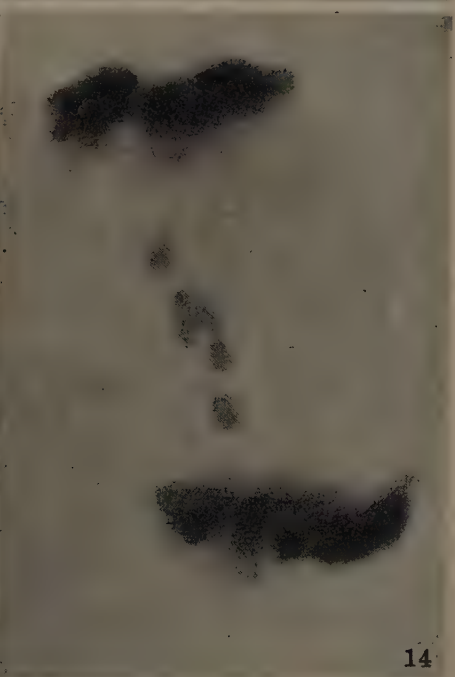
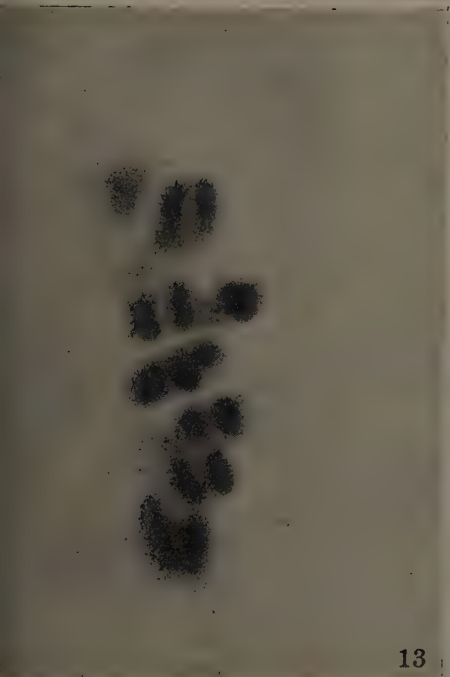
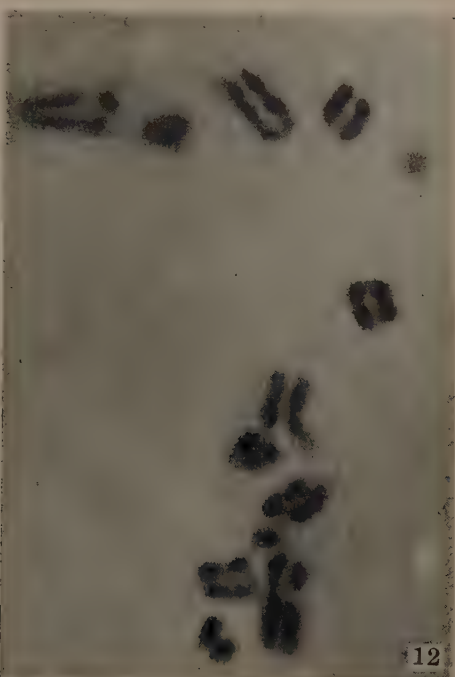
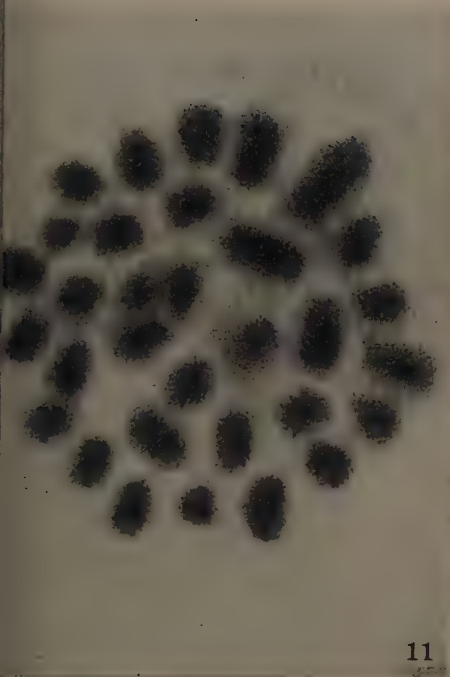
Fig. 11. — First metaphase, polar view, showing 29 bivalents and one complex body composed of four chromosomes. One bivalent is off the plate and so not in view.

Fig. 12. — A few late diplotene bivalents, the paired threads lying side by side and showing absence of chiasmata.

Fig. 13. — First metaphase, side view, showing a number of bivalents, the paired elements lying side by side without being chiasmally connected.

Fig. 14. — Late second anaphase, showing a few laggards on the spindle, which seem to be degenerating.

All the photo-micrographs have a magnification of $3600 \times$ approximately.



figures, as the rest of the 30 bivalents remain regular and unchanged. There are indications, however, that other bivalents undergo dissociation also, while the chromosomes with translocation form two bivalents.

The quadrivalent is formed, as has been mentioned above, only in a small proportion of cells, although the individual as a whole must be heterozygous.

The complex chromosomal body has a peculiar configuration: it is a sort of a rhomboid figure. The assumption of this shape, it may legitimately be supposed is due to the influence exercised by the two centres which tend to pull it in two diametrically opposite directions. At the first anaphase it persists intact for long after the paired elements of the bivalents have become dissociated and started moving polewards (Fig. 17). Observation of the fig. 17 makes it clear that in this case, the entire complex has moved intact towards one pole. Sometimes it becomes greatly stretched and drawn out parallel to the longitudinal axis of the spindle as if it were being subjected to a pull in two opposite directions, its rhomboid shape nearly disappearing. But it has never been observed to reach a pole intact and must be assumed to disintegrate ultimately, the univalents reaching the two poles normally.

As the chromosomes move polewards, it appears as if they have one terminal end directed towards the pole and not their entire length (Figs. 16, 17, 18 and 20). In rare cases this becomes abundantly clear and beyond dispute, as the chromosomes become long and drawn out and have one end pointing to the pole and the other end away from it (Fig. 18). This means the chromosomes of this species are monocentric. The same behaviour of chromosomes is noticed at the second anaphase and the spermatogonial anaphase.

A remarkable feature of the first anaphasic movement of chromosomes remains to be mentioned. The movement is asynchronous. Some chromosomes move much faster towards the pole than the others, with the result that there are groups of chromosomes at different levels on the first anaphase spindle, to be precise, two groups on each half spindle (Figs. 16 and 17). One bivalent persists intact on the spindle after the others have been resolved into separate univalents (Fig. 15) and the complex figure disintegrates last of all. In side view

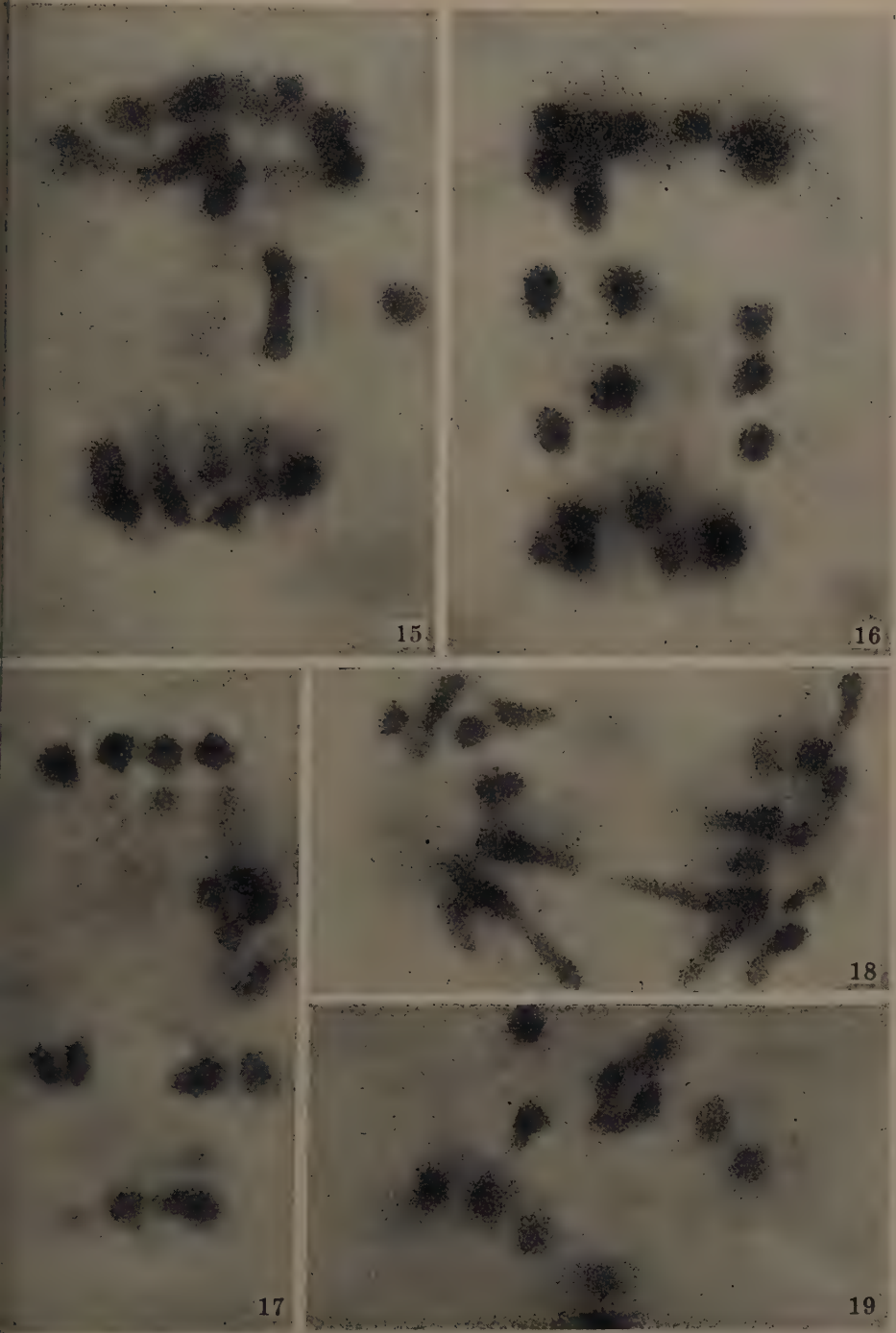
Fig. 15. — First anaphase, side-view. Most of the chromosomes have reached the poles but at the equator of the spindle there is a lagging bivalent still intact.

Fig. 16. — First anaphase, side view, showing asynchronous poleward movement of the chromosomes.

Fig. 17. — First anaphase, side view. The complex chromosomal body has moved intact from the equator towards one pole.

Fig. 18. — First anaphase, side view. Chromosomes have one end pointing towards the pole showing they are monocentric.

Fig. 19. — First anaphase, side view. The complex chromosomal body is still intact, although the other chromosomes have been separated from their partners and are moving polewards. All the photo-micrographs have a magnification of $3600 \times$ approximately.



the first anaphase chromosomes are hardly analyzable, but their number can be determined in polar view (Fig. 22). There are, in all reliable cases, thirtytwo chromosomes moving to one pole.



Fig. 20. — Second anaphase, side view. The mode of movement of chromosomes indicates that they are monocentric.

Fig. 21. — Second metaphase, showing 32 chromosomes - univalents.

Fig. 22. — First anaphase, polar view, showing 32 dyads.

Figs. 23 and 24. — Second anaphase, polar view, showing 32 univalents.

All the drawings have a magnification of $2500 \times$ approximately.

At the second metaphase occur 32 chromosomes (Fig. 21). These divide normally at the second anaphase and so each pole receives thirtytwo chromosomes (Figs. 23 and 24). All the spermatids are alike in this respect, as each contains thirtytwo chromosomes, but they must be of two kinds from the viewpoint of sex-determining chromosome mechanism, one kind containing the X-chromosome, the other, the Y-chromosome.

Occasionally some chromosomes lag behind the rest at the second anaphase and fail to reach the poles. It is not possible to determine whether these be the chromosomes that have suffered translocation or not (Fig. 14). They appear to be degenerating.

DISCUSSION

Centromere. — BRIEGER and KERR (1949) consider the chromosomes of the species of scorpions that they have studied to be polycentric or to possess diffuse centromeres. This conclusion is based upon the fact that during anaphase, the chromosomes, as they move polewards, present their entire length towards the pole, being constantly at right angles to the longitudinal axis of the spindle, and do not have one end directed towards the pole. This conclusion is also supported by the findings of RHOADES and KERR (1949), who have studied the effects of irradiation on chromosomes. PIZA thinks that the chromosomes of *Tityus* and *Isoctatus* are bicentric, as, at early anaphase, both ends of a chromosome are directed polewards. WHITE (1954) is inclined to agree with BRIEGER and KERR (1949), as he does not find the evidence adduced by PIZA to be convincing.

So far as *Palamnaeus* is concerned, the evidence is unequivocally in favour of the conclusion that the chromosomes are monocentric. Both at the spermatogenic and meiotic anaphases, chromosomes move polewards with their entire length parallel to the longitudinal axis of the spindle, so that only one end of any chromosome points towards the pole. Also, some of the chromosomes possess subterminal constrictions, which are clearly seen in spermatogonial metaphase chromosomes and in late diakinetid chromosomes. Such constrictions, however, are not observed at the first metaphase and first anaphase at all, but this might be due to the higher condensation of the chromosomes, totally concealing the constrictions. Be that as it may, it can be broadly stated that there is no evidence that this species of scorpion possesses bicentric or polycentric chromosomes. KARMA and his collaborator (1959) find that *Buthus* has bicentric chromosomes. However, one must wait till they publish their evidence before accepting this conclusion. *Opisthacanthus* studied by WILSON (1931) possesses monocentric chromosomes.

Absence of Chiasmata. — An extraordinary feature of meiosis in male scorpions is the absence of chiasmata from bivalents. This has been shown by PIZA in several species of scorpions. BRIEGER and GRANER (1943) claim to have observed evidence of the presence of chiasmata in the bivalents, which seems, however, to be of doubtful value. In the scorpion investigated by the present writers, the bivalents definitely lack chiasmata. At diplotene and early diakinesis most homologous chromosomes are disposed parallel to each other without ever coming in actual contact and without ever falling off. In cases of a few bivalents it does become difficult to decide whether chiasmata are present or not on account of the overlapping of the chromosomal threads. But as in the case of most of the bivalents chiasmata are demonstrably absent and at the first meta-

phase all the bivalents are clearly observed to be devoid of chiasmata, there is no reason to conclude that there is a possibility of the existence of chiasmata in those diplotene bivalents in which observation is rendered difficult by the overlapping and condensation of the chromosomal threads. Also, there is not enough evidence to show that chiasmata are actually present in the material studied by BRIEGER and GRANER. SHARMA and JONEJA (1959) state that in *Buthus* pachytene, diplotene and diakinesis stages are absent. This is surprising, especially when these stages are conspicuous in *Palamnaeus*. It is difficult to imagine why absence of chiasmata should entail abolition of these stages. Since DARLINGTON (1937) put forth his well-known view that chiasmata are responsible for holding together the paired chromosomes at the first metaphase, quite a number of cases have come to light in which the paired chromosomes are held together in total absence of chiasmata. It is clear that possibly the integrity of bivalent is always maintained by the operation of special forces whatever their nature. In scorpions it must be so, since chiasmata do not exist.

Reciprocal translocations. — The spontaneous occurrence of reciprocal translocations has been reported for several species of scorpions (PIZA 1939, 1944, 1943a and b, 1944, 1946, 1947a, b and c, 1948a, b and c, 1949, 1950a and b; SATO 1936; SHARMA and JONEJA 1959). The wide-spread occurrence of this phenomenon in scorpions, in species so widely removed geographically as Brazilian, Japanese and Indian, must be ascribed to constitutional peculiarities of the scorpion chromosomes. One pointer is furnished by the fact of the frequency of fragmentation and fusion of chromosomes in *Tityus bahiensis*, the Brazilian species most studied by PIZA. It obviously indicates that the chromosomes of these species are especially fragile. There is not enough data to find out if this can be generalized for scorpions as a whole.

To ascribe the formation of complex chromosomal bodies to reciprocal translocations seems to be the only reasonable explanation, for it is difficult to imagine how these constant figures could arise through unspecific attraction exercised by heterochromatic sections of chromosomes. In *Palamnaeus longimanus* the sex-chromosomes alone are heterochromatic and heterochromatization finds expression only during leptotene, disappearing as early as late pachytene. The autosomes are all devoid of heterochromatic segments. But on the view that the chromomeres represent heterochromatic regions of chromosomes (OEHLKERS and EBERLE 1957) — a conclusion which is still not fully established — each chromosome may be considered to be partly heterochromatic and partly euchromatic. But an association of some particular four or more chromosomes to form complex bodies cannot obviously be ascribed to this. Detailed study of the chromosomes of *Palamnaeus longimanus* has convinced the present writers that the formation of complex chromosomal bodies in this species must be ascribed to

reciprocal translocations and not to heterochromatization, as they previously did (RIVASTAVA and AGRAWAL 1960).

The fact that two such unusual phenomena as the absence of chiasmata and prevalence of reciprocal translocations, are general outstanding features of male meiosis in scorpions, leads one to surmise that probably they are not unrelated, since obviously reciprocal translocations may bring about crossing-over and thus compensate for absence of chiasmata. As a matter of fact, WHITE (1954) does seek to establish a correlation between the establishment of translocation and abolition of crossing-over due to failure of chiasma-formation. This seems to be justified. In the present case, for example, some of the viable gametes (e.g. AC, BD or AD, BC) will show recombination. Certain combinations other than these may be presumed to be lethal as they will entail deficiency or imbalance due to repetition of chromosome segments. The actual behaviour of these chromosomes at the first anaphase eludes study, as they are not clearly distinguishable after the disintegration of the complex chromosomal body. Absence of chiasmata and prevalence of translocations are not known for the females, although these are found in most of the male scorpions studied so far.

Some of the features of meiosis discussed above pose problems for which there appear no adequate solutions. There is no cytological reason indicated as to why chiasmata fail to arise even when chromosomes undergo pairing. It is obvious that during pachytene there is no breaking and rejoining of chromatids. This chromatid resistance to breaking is not consistent with the prevalence of fragmentation known in some species of scorpions. It is obvious that more information regarding the behaviour of scorpion chromosomes is urgently needed.

Asynchronism of chromosome movement. — The asynchronism of the movement of the first anaphase chromosomes of *Palamnaeus longimanus* is a curious and noteworthy feature. It may be accounted for by ascribing differential kinetochore reactivity to the different chromosome pairs of the complement, which may possibly indicate hybridization in the evolutionary history of the species. It is probably significant that the first anaphase chromosomes broadly fall into two groups from this point of view. It can probably constitute legitimate ground for speculating that each of the two synchronously moving groups of chromosomes presents the chromosome complement (probably haploid) of an ancestral scorpion. If, however, the chromosomes of the two ancestors whose hybrid *Palamnaeus longimanus* is, differed in their rates of movement during anaphase, this difference should be manifested not only at the first anaphase, but also at the second anaphase and the spermatogonial anaphase. This is actually observed, but not with such clearness as at the first anaphase. Nevertheless, it does not appear useful to speculate solely on the basis of such slender evidence.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to the U. P. Govt. Scientific Research Committee for the grant of a research assistantship to U. AGRAWAL and contingency money.

REFERENCES

- BRIEGER F. G. and GRANER E. A., 1943. — *On the cytology of Tityus bahiensis with special reference to meiotic prophase*. Genetics, **28**: 269-274.
- BRIEGER F. G. and KERR W. E., 1949. — *Sobre o comportamento mitótico e meiótico dos cromossomos policêntricos ou com ponto de inserção difuso*. Ann. Esc. Agric. Queiroz, **6**: 179-192.
- DARLINGTON C. D., 1937. — *Recent Advances in Cytology*. London.
- OEHLKERS F. and EBERLE P., 1957. — *Spiralen und Chromomeren in der Meiosis von Buthus levialis romana*. Chromosoma, **8**: 351-363.
- PIZA S. DE TOLEDO, 1939. — *Comportamento dos cromossomos na primeira divisão do espermatozócito do Tityus bahiensis*. Sci. Genet., **1**: 255-261.
- , 1940. — *Poliploidia natural em Tityus bahiensis (Scorpiones) associada a aberrações cromossômicas espontâneas*. Rev. Biol. Hyg., S. Paulo, **10**: 143-155.
- , 1943a. — *Meiosis in the male of the Brazilian Scorpion, Tityus bahiensis*. Rev. Agric., S. Paulo, **18**: 249-276.
- , 1943b. — *A propósito da meiose do Tityus bahiensis*. Rev. Agric., S. Paulo, **18**: 351-369.
- , 1944. — *A case of spontaneous end-to-end permanent union of two non-homologous chromosomes in the Brazilian scorpion Tityus bahiensis, accompanied by irregularities in pairing*. Rev. Agric., S. Paulo, **19**: 133-147.
- , 1946. — *Soldadura por uma das extremidades de dois cromossomos homólogos do Tityus bahiensis*. Ann. Esc. Agric. Queiroz, **3**: 339-346.
- , 1947a. — *Notas sobre cromossomos de alguns escorpiões brasileiros*. Ann. Esc. Agric. Queiroz, **4**: 169-176.
- , 1947b. — *Interessante comportamento dos cromossomos na espermatogênese do escorpião Isometrus maculatus De Geer*. Ann. Esc. Agric. Queiroz, **4**: 177-182.
- , 1947c. — *Uma raça cromossômica natural de Tityus bahiensis (Scorpiones-Buthidae)*. Ann. Esc. Agric. Queiroz, **4**: 183-192.
- , 1948a. — *Primeiras observações sobre os cromossomos de Tityus trivittatus Krphus (Scorpiones-Buthidae)*. Rev. Agric., S. Paulo, **24**: 177-180.
- , 1948b. — *Uma nova raça cromossômica natural de Tityus bahiensis (Scorpiones-Buthidae)*. Rev. Agric., S. Paulo, **24**: 181-186.
- , 1948c. — *Variações cromossômicas do Tityus bahiensis de São Joaquim*. Rev. Agric., S. Paulo, **24**: 187-194.
- , 1949. — *'Ouro Preto', nova e interessante raça cromossômica de Tityus bahiensis (Scorpiones-Buthidae)*. Sci. Genet., **3**: 147-159.
- , 1950a. — *Variações cromossômicas do Tityus bahiensis de Ribeirão Preto*. Ciênc. e Cult., **2**: 57-59.
- , 1950b. — *Observações cromossômicas em escorpiões brasileiros*. Ciênc. e Cult., **2**: 202-206.
- RHOADES M. M. and KERR W. E., 1949. — *A note on centromere organization*. Proc. Nat. Acad. Sci., Washington, **35**: 129-132.
- SATO I., 1936. — *On the chromosomes in spermatogenesis of the scorpion Buthus martensii Karsch*. Zool. Mag. Tokyo, **48**: 956-957.
- SHARMA G. P. and JONEJA M. G., 1959. — *Chromosome mechanism in the male scorpion (Buthidae-Scorpiones)*. Proc. Ind. Sci. Congr., Abstracts, 369.

- LOW I., 1913. — *Über die Spermatogenese der Skorpione*. Arch. Zellforsch., 9: 399-432.
- VASTAVA M. D. L. and AGRAWAL U., 1960. — *Studies on the structure and behaviour of the chromosomes of the scorpion Palamnaeus longimanus*. Proc. Ind. Sci. Congr., Abstracts, 493.
- ITE M. J. D., 1954. — *Animal Cytology and Evolution*. Cambridge.
- LSON E. B., 1931. — *The distribution of sperm-forming material in scorpions*. J. Morph., 52: 429-483.

SUMMARY

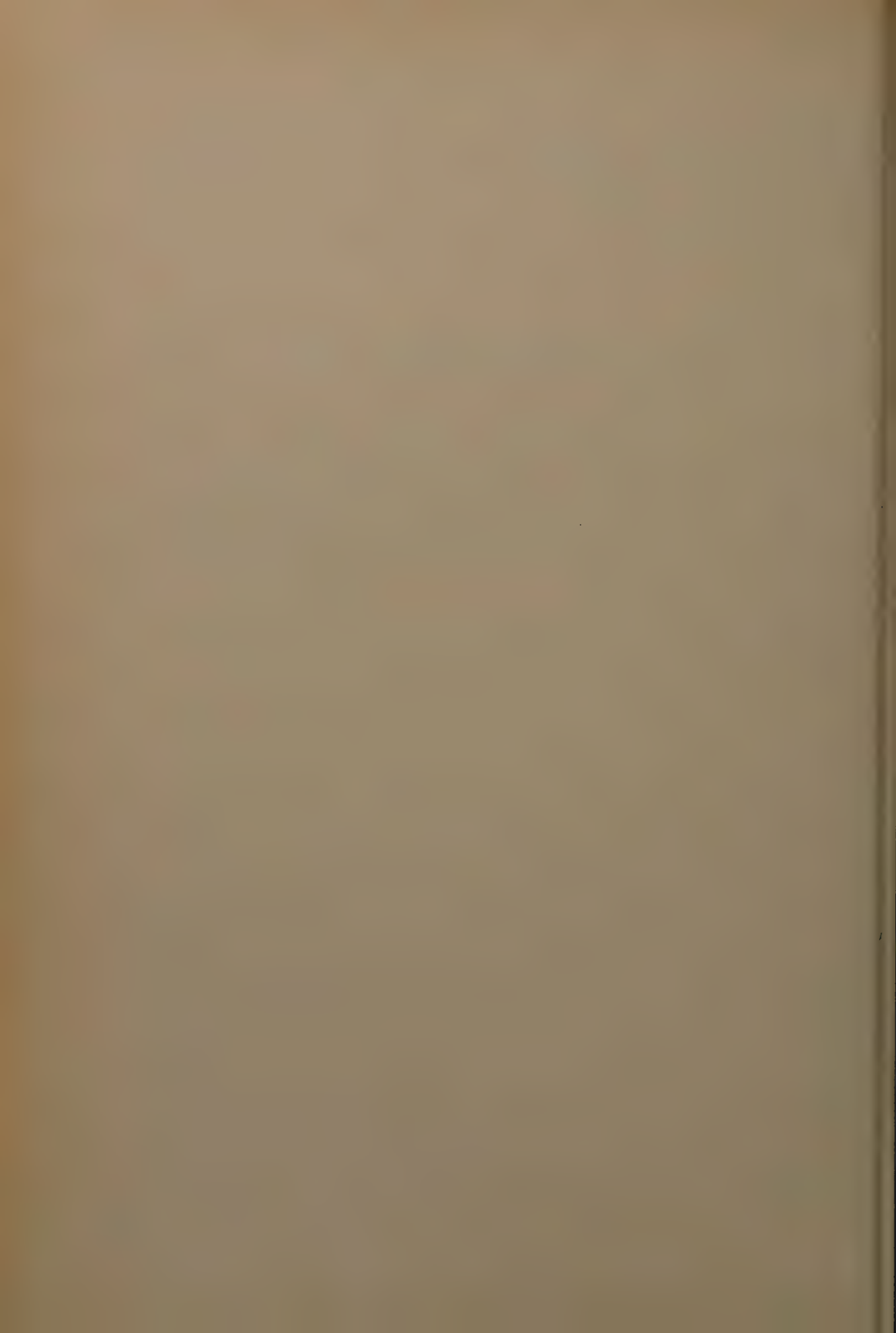
The behaviour of chromosomes during the spermatogenesis of the scorpion *Palamnaeus longimanus* has been studied. The following facts have been noticed:

1. The spermatogonial metaphase shows 64 chromosomes, and so does the oogonial metaphase.
2. The male is the heterogametic sex, possessing X- and Y- chromosome.
3. All the specimens of this species examined have been found to be reciprocal translocation heterozygotes for two pairs of chromosomes, which may, for example, be designated AB, BC, CD, DA. The behaviour of these chromosomes is subject to variation. Mostly they pair to produce, at the first metaphase, two bivalents, or a single quadrivalent; sometimes pairing fails altogether or partly, resulting in the appearance of four univalents or one valent and two univalents. Hence the total number of chromosomal bodies at the first metaphase fluctuates between 31 and 34. This fluctuation is due at times to the dissociation of bivalent chromosomes.
4. The bivalents lack chiasmata.
5. The first anaphase poleward movement of chromosomes is markedly asynchronous.
6. The chromosomes are monocentric.

RIASSUNTO

Nello scorpione *Palamnaeus longimanus* lo studio del comportamento dei cromosomi durante la spermatogenesi ha messo in luce i punti sotto elencati.

1. Alla metafase delle divisioni spermatogoniali appaiono 64 cromosomi; lo stesso numero riscontrato anche nelle divisioni cogeniali.
2. Il sesso maschile, possedendo i cromosomi X e Y, è eterogametico.
3. Tutti gli esemplari della specie esaminata sono eterozigoti da traslocazione reciproca interessante due paia di cromosomi, e possono per esempio essere indicati con AB, BC, CD, DA. Il comportamento di questi cromosomi è soggetto a delle variazioni. Per lo più essi appaiono per dare alla prima metafase due bivalenti o un solo quadrivalente; talvolta l'appaiamento manca del tutto o in parte, risultandone quindi quattro univalenti oppure un bivalente più due univalenti. Per questa ragione il numero totale dei corpi cromosomici alla prima metafase oscilla fra 31 e 34. Questa oscillazione a volte è dovuta alla dissociazione degli altri cromosomi.
4. I bivalenti mancano di chiasmi.
5. Il movimento verso i poli, alla prima anafase, è marcatamente asincrono.
6. I cromosomi sono monocentrici.



**RICERCHE CARIOLOGICHE ED EMBRIOLOGICHE
NELLE EUPHORBIACEAE. I - SU ALCUNI BIOTIPI DI EUPHORBIA
DULCIS L. DELLA TOSCANA**

GIULIANO CESCA
Istituto di Botanica dell'Università, Pisa

*In Redazione: il 15 Gennaio 1961**

INTRODUZIONE

I principali lavori sull'embriologia e sulla citologia dell'*Euphorbia dulcis* L. sono quelli dell'HEGELMAIER (1901, 1903) e del CARANO (1925, 1926).

L'HEGELMAIER, che si interessò per primo di questa specie, in piante prestanti per lo più una estrema riduzione nel numero dei fiori maschili (piante androe) ed una elevata sterilità del polline prodotto, scoprì un nuovo caso di embrionia e di embrionia avventizia. Alcune cellule della nucella intorno all'estremità micropilare del sacco embrionale, quando questo ha raggiunto un certo grado di sviluppo, si differenziano dalle altre, aumentano di volume e si dividono dando origine ciascuna ad un embrione. Questi embrioni sporgono dalla cavità del gametofito circondati dall'endosperma a nuclei liberi che intanto si è formato.

Accanto agli embrioni di origine nucellare ce ne sarebbe pure uno che per essere provvisto, a differenza degli altri, di sospensore, mostrerebbe chiaramente di aver avuto origine non da cellule della nucella ma dall'oosfera stessa. Data la grande proporzione di polline sterile, che rende improbabile la fecondazione, è necessaria comunque per la produzione di embrioni di origine nucellare, l'HEGELMAIER (1903) avanza l'ipotesi che l'*Euphorbia dulcis* Jacq. var. *purpurata* Guill., da lui studiata, sia insieme apomittica e partenogenetica, benchè non possa dare la prova che la fecondazione stessa effettivamente non avvenga.

Dal lavoro di HEGELMAIER (1903) si deduce pure che tra le sue piante dovevano esserci almeno alcuni individui in grado di produrre polline perfettamente fecondante: nelle figure 12-14 infatti ha disegnato dei granuli pollinici molto simili a quelli che ho riscontrato pure nei miei preparati e che in uno stadio di poco successivo mostrano ben evidenti anche i nuclei spermatici.

Queste ricerche lasciavano vari punti oscuri e principalmente quello riguar-

* Lavoro pubblicato con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

dante l'eventuale presenza in *Euphorbia dulcis* del fenomeno della partenogenesi. L'Autore stesso se ne rendeva conto ed attribuiva alle difficoltà tecniche opposte dal materiale il non aver potuto approfondire l'indagine.

CARANO, che lavorò molti anni dopo, non si pose soltanto il problema dell'origine degli embrioni in *Euphorbia dulcis* ma anche quello, del resto strettamente connesso al precedente e che HEGELMAIER non aveva nemmeno toccato della formazione del gametofito femminile. Mentre ai tempi di HEGELMAIER la letteratura embriologica riguardante il genere *Euphorbia* era ben scarsa (ROPER 1824; DE CANDOLLE 1827; LYON 1898), quando egli intraprese le sue ricerche le cose erano notevolmente mutate. I lavori di MODILEWSKI (1909, 1910, 1911) avevano dimostrato in *Euphorbia procera* (1909, 1910) ed in *Euphorbia palustris* (1911) la presenza del tipo *Penaea* e quello di CARANO (1915) in *Poinsettia* (= *Euphorbia*) *pulcherrima* R. Grah. un tipo di sviluppo intermedio tra il tipo normale e quello 16-nucleato. Si sapeva già quindi della esistenza nell'ambito dello stesso genere *Euphorbia* di tipi di sviluppo diversi da quello normale trovato nella maggior parte delle specie studiate fino allora: *Euphorbia corollata* LYON (1898); *E. salicifolia*, *E. meloformis*, *E. globosa*, *E. coralloides*, *E. variegata*, *E. Ipecacuanha*, *E. heterophylla*, *E. Lathyris* ed *E. helioscopia*, MODILEWSKI (1910); *E. virgata*, MODILEWSKI (1911); *E. helioscopia*, DONATI (1913); *E. Preslii* ed *E. splendens*, WENIGER (1917); *E. platiphylla*, SCHÜRHOFF (1924). Ciò nonostante nessuno avrebbe potuto sospettare che le sue ricerche sull'*Euphorbia dulcis* L. avrebbero portato non solo alla conferma della poliembrionia di origine nucellare, ma anche alla scoperta di un nuovo singolare tipo di sviluppo del sacco embrionale.

Per quanto riguarda la poliembrionia CARANO (1926) dimostrò: 1°) che è assolutamente indipendente dalla impollinazione e 2°) che, almeno nelle sue piante non v'era traccia di embrioni muniti di sospensore o comunque originati dall'atmosfera. Questa, benchè persista lungamente, finisce sempre per degenerare e scomparire schiacciata tra gli embrioni nucellari e l'endosperma sviluppatosi per divisione del nucleo secondario rimasto vergine.

I suoi individui dovevano essere tutti incapaci o quasi di produrre pollini effettivamente maturi: il granulo pollinico da lui disegnato (CARANO 1926, fig. 10) è infatti identico a quelli sterili e malformati che anch'io ho osservato in alcuni miei esemplari.

Nello stesso lavoro CARANO ritenne di poter dare pure il numero cromosomico delle sue piante. Tale numero, osservato nella micro- e nella mega-sporogenesi (vedi CARANO 1926, rispettivamente figg. 2a e 2b e fig. 14) sarebbe $n = 14$ ed osservato in cellule della nucella $2n = 28$. Questi numeri non hanno trovato finora conferma.

La sua vera scoperta nell'*Euphorbia dulcis* consiste invece nell'aver per primo osservato il particolare tipo di polarizzazione $1 + 3$ dei quattro nuclei

oriali dello stadio tetranucleato primario conseguente alla meiosi (CARANO 1925) e nell'aver saputo ben valutare l'importanza dei fatti da lui osservati, suggerendo (CARANO 1926) che questi potevano spiegare perfettamente alcuni fenomeni osservati da precedenti autori nella parte calazale del gametofito femminile di diverse piante (ad esempio in *Lilium Martagon* dalla SARGANT 1896; in *Lilium Gesneriana* da TREUB e MELLINK 1880 e dall'ERNST 1901, ecc.).

In base alle osservazioni di CARANO (1925), CHIARUGI (1927) stabilì il tipo di sviluppo del sacco embrionale « *Euphorbia dulcis* ». In base però al lavoro della BAMBAGIONI (1928) in cui è più compiutamente illustrato il processo di fusione dei nuclei calazali, SCHNARF (1936) propose il nome « tipo *Fritillaria* » tosto adottato anche da altri autori (MAHESHWARI 1937, 1941; FAGERLIND 1938, 1944). Circa la priorità della denominazione « tipo *Euphorbia dulcis* » su quella « tipo *Fritillaria* », almeno dal punto di vista puramente cronologico non vi sono dubbi (di anche MARTINOLI 1940). La grande maggioranza degli Autori tuttavia preferisce per varie ragioni parlare di « tipo *Fritillaria* » (MAHESHWARI 1947). Ritengo comunque che prima di decidere se la denominazione « tipo *Euphorbia dulcis* » sia da abbandonare definitivamente, o se sia più opportuno distinguere (BAMBAGIONI 1949) in seno allo stesso tipo fondamentale di sviluppo caratterizzato dalla polarizzazione 1 + 3, una serie *Fritillaria* ed una *Euphorbia dulcis*, si debbano riesaminare accuratamente le modalità della polarizzazione e della conseguente fusione dei corredi cromosomici dei tre nuclei calazali nell'*Euphorbia dulcis* stessa, onde chiarire alcuni punti oscuri lasciati da CARANO. Un suggerimento in questo senso era già stato dato da BATTAGLIA (1952).

L'ultimo ad essersi occupato dell'*Euphorbia dulcis* L. dal punto di vista embriologico è stato PERRY (1943) che peraltro si limitò a determinarne il numero cromosomico. Il numero cromosomico $2n = 12$ dato da questo autore trova conferma nella presente ricerca.

Fa meraviglia che una specie come l'*Euphorbia dulcis* L., così interessante dal punto di vista embriologico e citologico, ed in cui le ricerche compiute finora non hanno mai portato ad una conclusione definitiva, ma hanno forse suggerito problemi di quanti ne abbiano risolti, sia ormai da tanti anni completamente trascurata dagli embriologi. Il fatto stesso che alcune flore ne riportino più volte invoglia all'indagine.

L'*Euphorbia dulcis* L. appartiene secondo PAX ed HOFFMANN (1931) alla sezione *Tithymalus* (Hall.) Boiss. sottosezione *Galarrhaei* Boiss. È diffusa in tutta l'Europa media e nella Russia media e meridionale. MEUSEL (1943) la considera tra le piante « Süd-europäisch-montan-mitteleuropäische ». Per quanto riguarda l'Italia, PARLATORE (1867) annota: « Nei luoghi ombrosi dei boschi della regione della Querce, del Faggio e dell'Abeto fino a 1600 metri sul livello del mare, di tutte le parti settentrionali e centrali della penisola sino agli Appennini delle

Marche e degli Abruzzi a Pizzo di Sivo. Raramente discende nella regione dell'Oliveto come vicino a Firenze lungo l'Ema e nell'Isola del Giglio dove l'ho raccolta ».

La specie più affine all'*Euphorbia dulcis* L. è l'*Euphorbia angulata* Jacq.

Mentre le flore straniere, ad es. HEGI, DOUIN e PROKHANOV riportano in genere per l'*E. dulcis* L. più varietà e considerano *E. angulata* Jacq. una specie buona (*subsp.* secondo DOUIN), il FIORI (1925-1929) riduce questa a varietà dell'*E. dulcis* L. assieme alla varietà *typica* Fiori.

MATERIALE E TECNICA

La ricerca è stata condotta soltanto su materiale raccolto personalmente in diverse località della Toscana, che saranno indicate in seguito trattando dei diversi biotipi.

Il materiale per lo studio embriologico è stato fissato per lo più in campagna esclusivamente con liquido di Karpetschenko. Ho fatto particolare attenzione a non confondere quello proveniente da diversi individui. Questi sono stati raccolti e sono tutt'ora coltivati in vaso nell'Orto Botanico dell'Università di Pisa. Le sezioni embriologiche sono state colorate per lo più con ematossilina Heidenhain. Buoni risultati non sono stati ottenuti solo per gli stadi immediatamente successivi alla penetrazione del tubetto pollinico nel sacco embrionale. Il materiale proveniente dalle sinergidi in degenerazione si colora infatti troppo intensamente in nero offuscando buona parte della porzione micropilare del gametofito tutt'intorno all'oosfera. Questa difficoltà è stata superata ricorrendo alla colorazione con fucsina basica (Feulgen) seguita o meglio da altra colorazione con verde luce, secondo la scheda: idrolisi a freddo in 1/2 HCl conc. + 1/2 H₂O per 20-25 minuti; reattivo di Schiff per 1-3 ore; H₂O distill. con qualche goccia di acido acetico: 1 minuto; lavaggio in acqua di fonte; alcool 60%: alcuni minuti; (verde luce 0,25% in alcool a 90°); alcool a 95°: 1/2 ora circa; alcool assoluto I°, II° e III°: + ore; « Euparal essence » e quindi chiusura con « Euparal ». Per maggiori particolari sulla tecnica seguita cfr. BATTAGLIA 1957b.

Per lo studio degli apici radicali è stato seguito l'usuale metodo dello schiacciamento al Feulgen ⁽¹⁾ dopo pretrattamento in colchicina 0,2% in soluzione saturata in paradichlorobenzene (BATTAGLIA 1957a) e fissaggio in Carnoy (3 alcool + 1 ac. acetico).

La maggiore difficoltà sta nell'ottenere abbondante materiale da una stessa pianta. Gli individui coltivati in vaso fuori dal loro ambiente ne risentono in modo particolare e spesso non danno la produzione desiderata.

RISULTATI

Biotipo diploide ed anfimittico.

Di tutte le piante studiate ho trovato che appartengono a questo biotipo solo quelle raccolte nel bosco di faggio e di *Picea* della « Foresta di Abetone » (Hegi).

(1) Per questa tecnica citologica alcuni usano impropriamente l'espressione « striscio » anziché « schiacciamento ». A parte il fatto che lo « striscio » costituisce un procedimento ben diverso e ben noto ad es. in ematologia, l'improprietà linguistica sopra citata è già stata

a) a cominciare dal 6°-5° Km dal Passo dell'Abetone. L'*Euphorbia dulcis* L. è appunto uno dei costituenti del sottobosco di tale foresta. È facile incontrarne gruppi di individui sia individui isolati, che talvolta, specialmente in qualche ve radura soleggiata dove la faggeta è tenuta a ceppaia, crescono in rigogliosi puglietti. Nel luogo di raccolta dei miei esemplari e nelle immediate vicinanze ho notato le seguenti altre specie: *Picea excelsa* Lk., *Fagus silvatica* L., *Platanoides* L., *Pirus Aucuparia* Ehrh., *Cytisus Laburnum* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Polypodium Dryopteris* L., *Veratrum album* L., *Polygonatum multiflorum* All., *Anemone nemorosa* L., *Aquilegia vulgaris* L., *Fragaria vesca* L., *Galium montanum* L., *Oxalis Acetosella* L., *Primula officinalis* Hill, *Tussilago Farfara* L., *Prenanthes purpurea* L.

Non sono ancora in grado di stabilire se vi siano caratteri morfologici in base ai quali si possa distinguere l'uno dall'altro i diversi biotipi. Comunque le piante del biotipo diploide dell'Abetone da me esaminate hanno sempre anche naturalmente la cassula cosparsa di radi peli tra le verruche e lungo il rafe dei carali. Ritengo perciò che si possa avanzare l'ipotesi che si tratti dell'*Euphorbia dulcis* L. var. *lasiocarpa* Neilreich. Altre importanti caratteristiche di queste piante sono:

- 1) stami sempre numerosi, mai ridotti ad uno solo o mancanti;
- 2) cassule con verruche verdi anche a maturità.

Nella figura 1 presento la fotografia di una piastra metafaseica diploide ottenuta per « schiacciamento » di apici radicali. Si osservano 12 cromosomi di cui particolarmente caratteristiche le due coppie di cromosomi corti. Il cariotipo (figg. 1, 5) risulta costituito dai seguenti tipi cromosomici⁽²⁾:

: tipo medio a centromero subterminale;

: » » » » »

: » » » » »

: » » » » »

: tipo corto, a due braccia pressochè uguali con centromero submediano;

: tipo corto (molto più del precedente), isobrachiale, con centromero mediano.

La formula di questo biotipo è quindi:

$$z = 2n = 12 = 2M_1 + 2M_2 + 2M_3 + 2M_4 + 2S_1 + 2S_2$$

Ho potuto notare più volte 12 cromosomi in cellule della nucella. In metafasi del nucleo generativo del polline ho contato 6 cromosomi; lo stesso numero riscontrato pure nel gametofito femminile.

po discussa e risolta dagli autori di lingua inglese con riferimento ai termini « squash » e « near » (LIMA DE FARIA 1954).

(2) Ho seguito la terminologia proposta da BATTAGLIA (1955).

L'abbondanza di polline prodotto e l'aver spesso osservato sugli stili numerosi granuli pollinici mi indussero fin da principio a sospettare l'esistenza di normale anfimissi. L'indagine embriologica subito avviata mi ha portato ben presto a concludere positivamente.

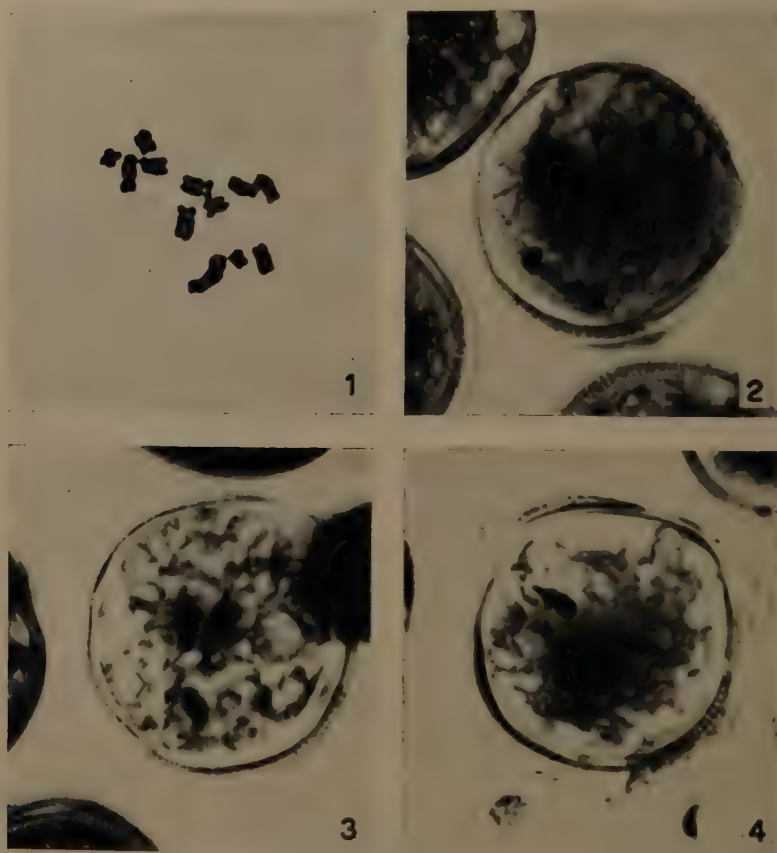


Fig. 1. — Piastra metafasica, in apice radicale, del biotipo diploide anfimittico dell'Abetone $z = 2n = 12$. Ingr. $\times 1700$.

Figg. 2-4. — Granuli pollinici del biotipo diploide, ancora all'interno dell'antera. Sono chiaramente visibili i nuclei spermatici ed il nucleo vegetativo. Ingr. $\times 1200$.

Nel polline la divisione del nucleo generativo avviene già nell'antera (Figg. 2-4). Il granulo pollinico giunto sullo stimma germina emettendo da un poro germinativo il tubetto pollinico. Questo attraverso lo stilo e l'otturatore giunge in prossimità dell'ovulo. Difficile riesce seguirne il corso specialmente tra le fibre allungate dell'otturatore, che attraverso il micropilo si spingono tal-

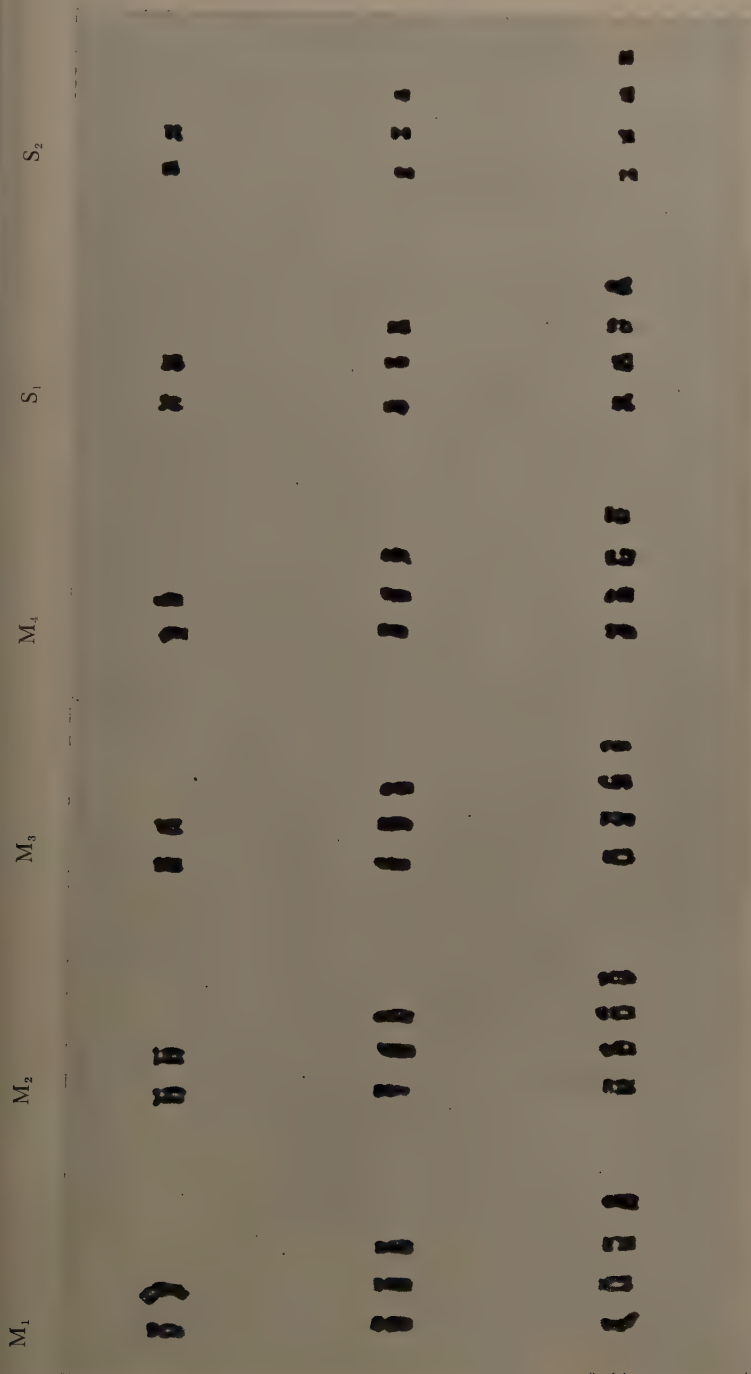


Fig. 5. — Corredi cromosomici di *Euphorbia dulcis* L. ordinatamente disposti in gruppi e contrassegnati dai rispettivi simboli. In alto: biotipo diploide ($2n = 12$). In mezzo: biotipo triploide ($3n = 18$). In basso: biotipo tetraploide ($4n = 24$). Ingr. $\times 1700$.

volta fino a toccare la punta del becco della nucella. Qui però, mentre questi si arrestano, il tubetto pollinico penetra invece decisamente tra le cellule lasciando una traccia a lungo ben evidente (Fig. 6a). Continuando nel suo corso entra nel sacco embrionale determinando la degenerazione di una e di conseguenza anche dell'altra sinergide.

Avvenuta la formazione dello zigoto (Figg. 6a e 6b), questo conserva per un periodo più o meno lungo il nucleo in riposo. La prima divisione (Figg. 7b, 7c, 7d) avviene secondo un piano trasversale dando un proembrione a due cellule. Nè a questo stadio nè in stadi successivi ho notato nelle cellule della nuova cella alcuna attività tendente a produrre embrioni avventizi.

Meno chiaro è il comportamento del nucleo secondario della cellula proendospermatica. Non ho veduto in atto la fusione dei due nuclei polari col nucleo spermatico, ho tuttavia osservato alcune volte la presenza di nuclei spermatici all'interno del gametofito quando l'endosperma aveva già raggiunto uno stadio a due od a quattro nuclei. Le ricerche attualmente in corso spero che mi permetteranno di dire se si tratta di polispermia o di altro fenomeno.

Ho osservato pure notevoli anomalie concernenti il gametofito femminile. La figura 8 rappresenta un gametofito adulto in cui, probabilmente per un effetto di cellularizzazione, al polo micropilare si è formata solamente l'oosfera; nella cellula proendospermatica sono rimasti ben quattro nuclei polari.

Biotipo triploide.

Le piante in mio possesso appartenenti a questo biotipo provengono da tre distinte località: dall'Abetone, cioè dallo stesso luogo in cui ho raccolto il biotipo diploide, dalle Alpi Apuane e dalle Cerbaie (Valdarno inferiore). Gli esemplari delle Alpi Apuane li ho raccolti esattamente tra le rocce all'ingresso della « Buca dell'uomo selvatico », un profondo inghiottitoio che si apre nella faggeta a qualche centinaio di metri dal Rifugio della Pietrapana (Levigliani). Quelli delle Cerbaie invece nel bosco di Vaiano presso Bientina (Pisa) sul fondo di un vallone rivolto a nord e coperto da una fitta boscaglia di *Alnus glutinosa*, *Ostrya carpinifolia*, *Salix cinerea*, *Rhamnus Frangula*, *Ilex Aquifolium* resa più fitta da cespugli di *Rubus*. Sul terreno mantenuto costantemente umido da un ruscello vegeta appunto l'*Euphorbia dulcis* L. assieme ad altre piante quali: *Arisarum prolatum* Savi, *Polygonatum officinale* All. *Leucojum vernum* L., *Anemone nemorosa* L., *Vaccinium Myrtillus* L., *Myosotis palustris* Hill., *Ajuga reptans* L., *Gallium vernum* Scop.

Purtroppo non ho ancora potuto seguire alcun individuo in tutti gli stadi del suo ciclo vegetativo. Solo gli esemplari delle Alpi Apuane erano provvisti al momento della raccolta di cassule, che ad un accurato esame risultarono assolutamente glabre.

Il kariogramma di questo biotipo (Figg. 9 e 5) risulta essere così costituito:

$$z = 3n = 18 = 3M_1 + 3M_2 + 3M_3 + 3M_4 + 3S_1 + 3S_2.$$

biotipo tetraploide ad embrionia sporofitica nucellare ⁽³⁾.

Ho raccolto piante appartenenti a questo tipo nel Monte Pisano, presso Vecchia, lungo le sponde del Rio San Pantaleone. È questo un ruscello, ricco d'acque per la più parte dell'anno, che scende dal M. Faeta lungo una valle rivolta a nord-ovest. Seguendo il corso del ruscello si spingono nella zona degli uliveti, attraverso la pineta e la macchia di leccio, di *Myrtus*, *Arbutus Unedo*, *Quercus arborea* ed *E. scoparia*, *Ulex europaeus*, ecc. il castagno, l'*Ilex Aquifolium*, *Juniperus glutinosa*, il *Fraxinus Ornus*, *Quercus sp.*, ecc. All'ombra di queste piante lungo il letto del ruscello o lungo le sue sponde in luoghi particolarmente umidi, e riparati dal vento, si osservano estesi tappeti di muschi, molte felci (*Polypodium vulgare* L., *Polystichum aculeatum* Roth., *Asplenium fontanum* Bernh. v. *ovatum* (Viv.), *A. Filix-foemina* Bernh., *Scolopendrium vulgare* Sm., *Blechnum patens* Roth., *Osmunda regalis* L.), *Erythronium Dens-canis* L., *Crocus vernus* L., *Orchis maculata* L., *Anemone nemorosa* L., *Fragaria vesca* L., *Oxalis acetosella* L., *Euphorbia amygdaloides* L., *Galium verum* Scop. È l'ambiente nel quale vive pure l'*Euphorbia dulcis* L. Di questa specie ho osservato anzi piante di due tipi, le une accanto alle altre e cioè: a) piante con stami numerosi e con capsule a verruche verdi a maturità, b) piante con stami ridotti ad uno solo o talmente mancanti e con capsule a verruche purpuree a maturità. Quelle a verruche verdi e con stami numerosi producono polline regolare di dimensioni superiori a quello delle piante del biotipo diploide (Figg. 11 e 12). In quelle a verruche purpuree e con uno stame (o stami mancanti) ho osservato finora solo polline che abortisce, identico a quello disegnato da CARANO (1926, fig. 16) come « granello di polline adulto con pori di germinazione ». Tanto le piante di questo tipo che quelle dell'altro presentano poliembrionia sporofitica nucellare e diploidia sicuramente accertate. Per poter collegare e spiegare più esaurientemente questi dati sono in corso ulteriori osservazioni relative all'antesi come pure nuove e più vaste indagini cito-embriologiche.

Il biotipo a verruche rosse è risultato possedere un corredo cromosomico tetraploide (Figg. 5, 10) caratterizzato dalla seguente formula cromosomica ⁽⁴⁾:

$$z = 4n = 24 = 4M_1 + 4M_2 + 4M_3 + 4M_4 + 4S_1 + 4S_2.$$

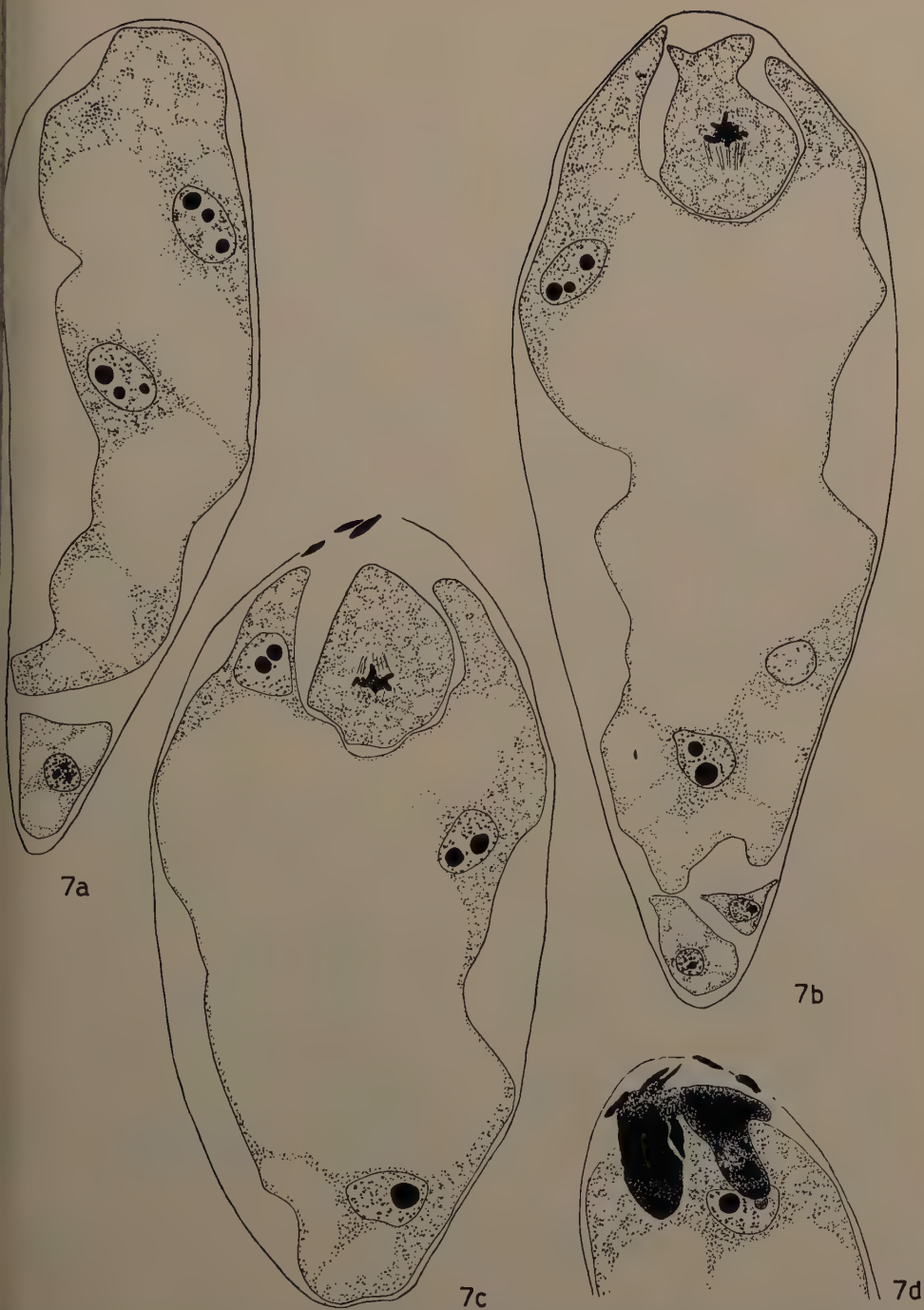
⁽³⁾ Per questo termine « embrionia sporofitica » cfr. BATTAGLIA 1947.

⁽⁴⁾ Essendo stata esaminata una sola pianta sono in corso ricerche kariologiche intese a controllare se gli individui a verruche rosse sono, oppure no, esclusivamente tetraploidi.



Figg. 6a e 6b. — È avvenuta la fecondazione; al polo micropilare si osserva lo zigoto ed i resti delle sinergidi in disfacimento. Tra le cellule della nucella è ancora evidente il tubetto pollinico. L'endosperma è alla sua seconda divisione. Alla calaza, le tre antipodi. Ingr. $\times 800$ ca.

Fig. 8. — Gametofito 8-nucleato anomalo: al micropilo si è cellularizzata solo l'oosfera; nella cellula proendospermatrice sono rimasti ben quattro nuclei polari. Ingr. $\times 800$ ca.



Figg. 7a-7d. — Diverse sezioni di uno stesso ovulo. Figg. 7b e 7c: prima divisione dello zigoto. Fig. 7d: resti delle sinergidi in disfacimento. L'endosperma precedendo lo zigoto di alcune divisioni possiede già 8 nuclei. Ingr. $\times 800$ ca.

Osservazioni sulla poliembrionia sporofitica nucellare.

Come dimostrato da HEGELMAIER (1901, 1903) e da CARANO (1926), quando il gametofito femminile ha raggiunto la maturità, alcune cellule della nucella si differenziano dalle altre e dividendosi danno origine ad alcuni embrioni sporofitici. In conseguenza di questo processo, l'oosfera, che persiste a lungo intatta, rimane inclusa ed apparentemente schiacciata tra l'endosperma, che intanto si è formato, e gli embrioni nucellari. CARANO (1926) discute a lungo sulle cause che possono determinare il differenziamento e la proliferazione delle cellule della nucella. Egli non esclude come causa diretta immediata la liberazione di ormoni dalle sinergidi e dall'oosfera o da altre cellule in degenerazione nell'ambito del gametofito, secondo la teoria dei necrormoni di Haberlandt. Le osservazioni compiute mi permettono di negare senz'altro questa ipotesi; spesso cellule della nucella cominciano a differenziarsi ben prima che le sinergidi o l'oosfera diano segni di degenerazione, e la presenza di qualche cellula della nucella in disfacimento non ha valore perchè costituisce un aspetto normale anche in piante che non presentano poliembrionia. Le figure 13a e 13b mostrano un gametofito adulto in cui per un'attività quasi tumultuosa delle cellule della nucella numerosi embrioni sporofitici hanno iniziato lo sviluppo nella regione micropilare; non soltanto l'oosfera, ma anche le sinergidi persistono ben evidenti e non danno segno di degenerazione; l'endosperma ha raggiunto lo stadio 8-nucleato ed alla calaza sono ancora visibili le tre antipodi.

Le presenti ricerche dimostrano inoltre che il manifestarsi della poliembrionia sporofitica è in diretto rapporto con la poliploidia, cioè con un fenomeno che CARANO non menziona, ammettendo come assai probabile l'origine ibrida della specie.

Sulla presenza in « Euphorbia dulcis » L. di diversi tipi di sviluppo del gametofito femminile.

Ho già accennato precedentemente, trattando del biotipo diploide anfimitico, a frequenti anomalie nello sviluppo e costruzione del gametofito femminile (Fig. 8). In piante del medesimo biotipo ho osservato pure la presenza di stadi che fanno supporre l'esistenza del « tipo *Pyrethrum cinerariaefolium* » (MARTINOLI 1939).

In una pianta del tipo « senza stami » ho osservato il gametofito riprodotto nelle figg. 14a e 14b. Tale gametofito va senz'altro inquadrato nel « tipo *Pyrethrum parthenifolium* 16-nucleato » con la particolarità della presenza di quattro nuclei polari anzichè due soltanto, come di regola.

Questo tipo di sviluppo che è stato riscontrato da tempo nella famiglia delle Euphorbiaceae è però nuovo per il genere *Euphorbia*, in cui si conosceva finora

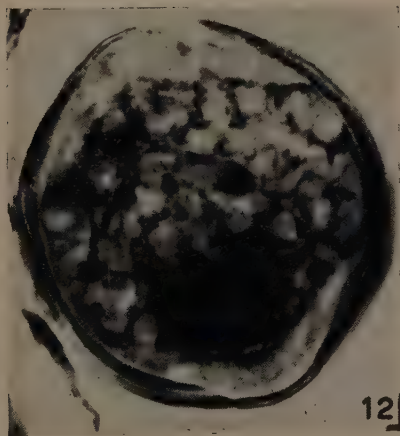
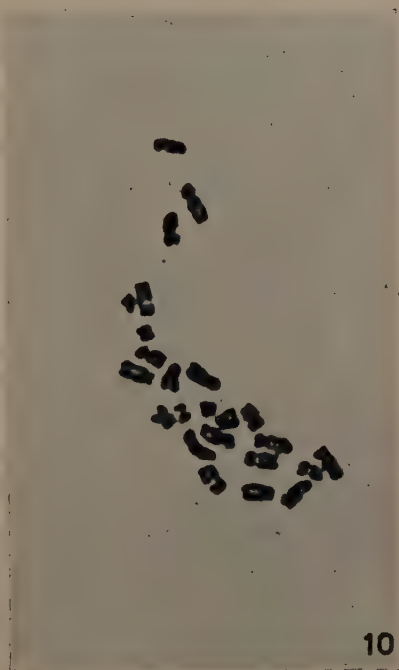
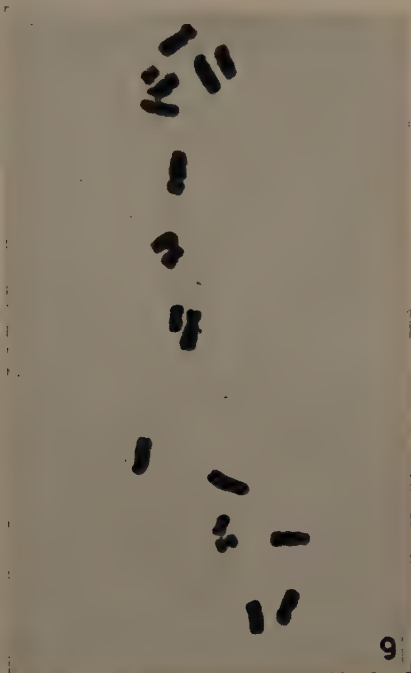
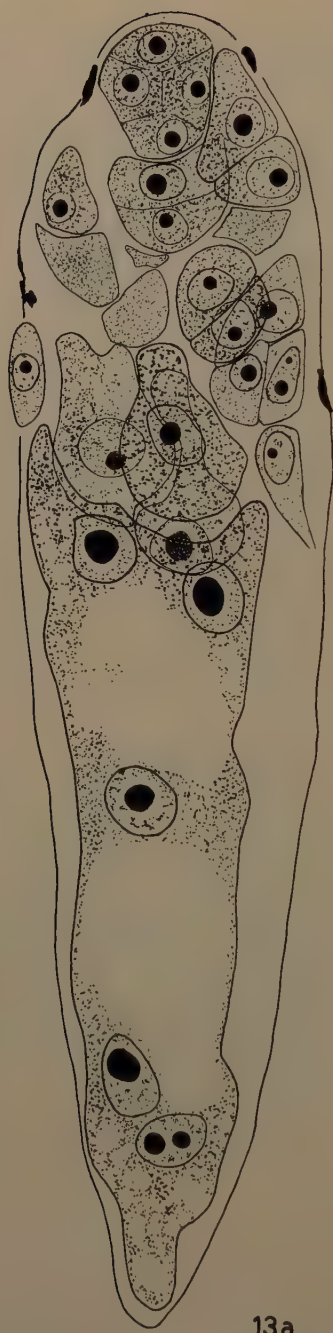


Fig. 9. — Piastra metafasica, in apice radicale, del biotipo triploide: $z = 3n = 18$. Ingr. $\times 1700$.

Fig. 10. — Piastra metafasica, in apice radicale, del biotipo tetraploide ad embrionia sporofitica del Monte Pisano: $z = 4n = 24$. Ingr. $\times 1700$.

Figg. 11 e 12. — Granuli pollinici del biotipo ad embrionia sporofitica e con cassule a verruche verdi del Monte Pisano: notare la differenza di dimensioni rispetto al polline delle piante diploidi (vedi Figg. 2-4). Ingr. $\times 1200$.



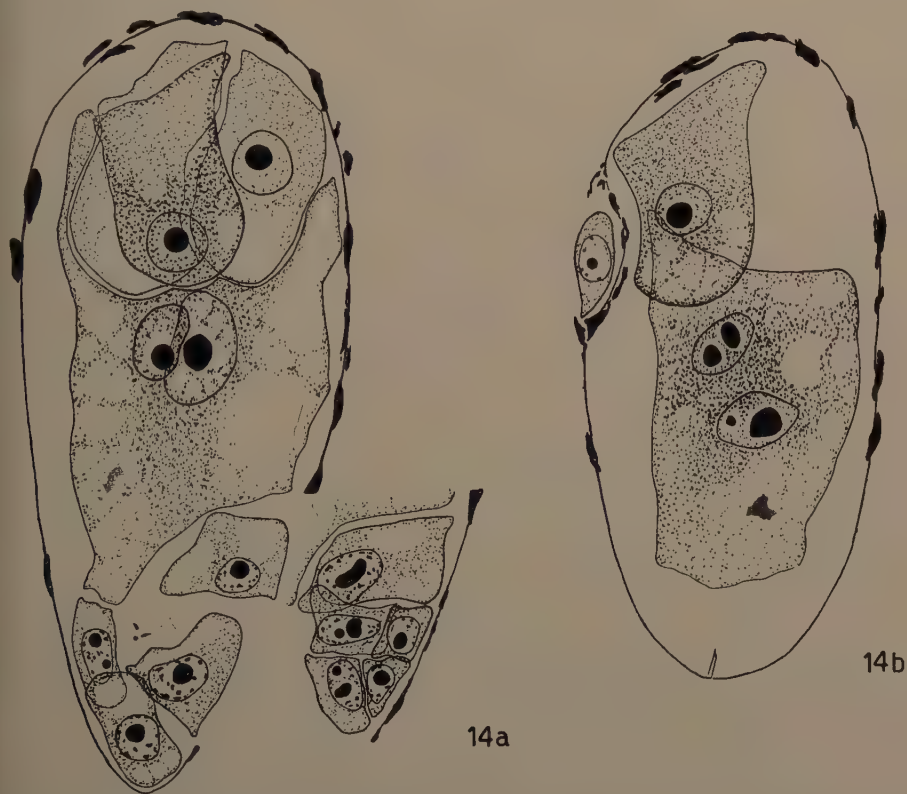
13a



13b

Figg. 13a e 13b. — Un interessante esempio dell'embrionia sporofitica nei biotipi del Monte Pisano. Ingr. $\times 800$ ca.

solo il tipo Normale (per la gran maggioranza delle specie studiate), il tipo *Al-
tium* per *Euphorbia mauritanica* L. (VENTURA 1933), *E. Characias* L. ed *E. amy-
gdaloides* L. (D'AMATO 1939), *E. Lagascae* Spreng. (D'AMATO 1946), il tipo *Penaea*
per *E. procera* (MODILEWSKI 1909, 1910) ed *E. palustris* L. (MODILEWSKI 1911),
ed infine il tipo *Euphorbia dulcis* esclusivamente per la specie oggetto della pre-
sente indagine.



Figg. 14a e 14b. — Esempio di gametofito adulto costruito secondo il tipo *Pyrethrum parthe-
nocarpum* 16-nucleato. Ingr. $\times 800$ ca.

Conclusioni.

L'esistenza di rapporti poliploidi fra specie diverse del genere *Euphorbia*
è nota da tempo. Meno nota è invece la poliploidia intraspecifica (PERRY 1943;
MOORE 1953, 1958). La presente ricerca, dimostrando l'esistenza in *Euphorbia
dulcis* L. di diversi biotipi poliploidi, in cui questo fenomeno si presenta stretta-
mente collegato al manifestarsi della poliembrionia sporofitica e ad una riduzione

generale della sessualità (scomparsa della anfigmisa e riduzione del numero degli stami), riveste quindi un particolare interesse.

In *Euphorbia dulcis* L. rimangono ancora aperti numerosi problemi, sia cito-embriologici che tassonomici, che saranno affrontati quanto prima con nuove ricerche su più abbondante materiale.

Ringrazio vivamente i Chiar.mi Proff. GIUSEPPE MARTINOLI ed EMILIO BATTAGLIA per il costante interessamento ed aiuto prestatimi nel corso dell'intera ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- BAMBACIONI V., 1928. — *Ricerche sulla ecologia e sulla embriologia di Fritillaria persica* L. Annali di Botanica, **18**: 7-37.
- BATTAGLIA E., 1941. — *Contributo all'embriologia delle Tamaricaceae*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **48**: 575-612.
- , 1947. — *Sulla terminologia dei processi apomittici*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **54**: 674-696.
- , 1952. — *Ricerche embriologiche su Rudbeckia columnaris* Sims. Atti Soc. Toscana Sc. Nat., s. B, Memorie, **59**: 172-197.
- , 1955. — *Chromosome morphology and terminology*. Caryologia, **8**: 179-187.
- , 1957a. — « Simultaneous » and « Successive Pretreatments » in *Chromosome Analysis*. Caryologia, **9**: 370-371.
- , 1957b. — *A Simplified Feulgen Method using cold hydrolysis*. Caryologia, **9**: 372-373.
- BOHN P. R., 1924. — *Sur le sac embryonnaire des Euphorbes*. Bull. Soc. Bot. de France, **71**: 576-579.
- CARANO E., 1915. — *Sull'embriologia di Poinsettia pulcherrima* R. Grah. Annali di Botanica, **13**: 343-350.
- , 1925. — *Sul particolare sviluppo del gametofito ♀ di « Euphorbia dulcis »* L. Rendic. R. Accad. Lincei, Cl. Sci. Fis., ser. VI, **1** (1°): 633-635.
- , 1926. — *Ulteriori osservazioni su Euphorbia dulcis* L., in rapporto col suo comportamento apomittico. Annali di Botanica, **17**: 50-79.
- CHIARUGI A., 1927. — *Il gametofito femminile delle Angiosperme nei suoi varî tipi di costruzione e di sviluppo*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **34**: 5-133.
- D'AMATO F., 1939. — *Ricerche embriologiche e cariologiche sul genere Euphorbia*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **46**: 470-509.
- , 1946. — *Nuove ricerche embriologiche e cariologiche sul genere Euphorbia*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **53**: 405-436.
- DE CANDOLLE, 1827. — *Org. vég.* III. — Citato da HEGELMAIER 1901.
- DONATI G., 1913. — *Ricerche embriologiche sulle Euphorbiaceae*. Annali di Botanica, **11**: 395-399.
- DOUIN R. — *Euphorbiaceae*. In: *Flore complète illustrée en couleurs de France Suisse et Belgique* par G. Bonnier. Tome dixième. Paris.
- ERNST A., 1901. — *Beiträge zur Kenntniss der Entwicklung des Embryosackes und des Embryo (Polyembryonie) von Tulipa Gesneriana* L. Flora, **88**: 37-77.
- FAGERLIND F., 1938. — *Wo kommen tetrasporische durch drei Teilungsschritte vollentwickelte Embryosäcke unter den Angiospermen vor?* Bot. Not., pp. 461-498.
- , 1944. — *Der tetrasporische Angiospermen-Embryosack und dessen Bedeutung für das Verhältnis der Entwicklungsmechanik und Phylogenie des Embryosacks*. Ark. f. Bot., **31** A: 1-71.
- FIORI A., 1925-1929. — *Nuova Flora analitica d'Italia*, vol. II°. Firenze.

- HEGELMAIER F., 1901. — *Ueber einen neuen Fall von habitueller Polyembryonie*. Ber. deutsch. bot. Gesell., **19**: 488-499.
- , 1903. — *Zur Kenntnis der Polyembryonie von Euphorbia dulcis Jacq. (purpurata Thuill.)*. Ber. deutsch. bot. Gesell., **21**: 6-19.
- HEGI G. — *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. V. Band. I. Teil. J. F. Lehmanns Verlag. München.
- LIMA DE FARIA A., 1954. — *The difference between a smear and a squash*. Hereditas, **40**: 533-535.
- LYON F. M., 1898. — *A contribution to the life history of Euphorbia corollata*. Botanical Gazette, **25**: 418-426.
- MAHESHWARI P., 1937. — *A critical Review of the tips of embryo-sacs in Angiosperms*. New Phytol., **36**: 359-417.
- , 1941. — *Recent work on the types of embryo-sacs in Angiosperms*. Journ. Indian Bot. Soc., **20**: 229-261.
- , 1947. — *The Fritillaria type of embryo-sac: a critical review*. Journ. Indian Bot. Soc., M.O.P. Iyengar Comm. Vol. : 101-119.
- MARTINOLI G., 1939. — *Contributo all'embriologia delle Asteraceae: I-III*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **46**: 259-298.
- , 1940. — *La priorità della denominazione « Tipo Euphorbia dulcis » (1927) sulla denominazione « Tipo Fritillaria » (1937)*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n.s., **47**: 464-468.
- MEUSEL H., 1943. — *Vergleichende Arealkunde*. Berlin-Zehlendorf.
- MEZZETTI-BAMBACIONI V., 1949. — *Sull'embriologia della Fritillaria messanensis Raf. e sull'opportunità di distinguere una serie Fritillaria nel tipo Euphorbia dulcis*. Annali di Botanica, **23**: 116-138.
- MODILEWSKI J., 1909. — *Zur Embryobildung von Euphorbia procera*. Ber. deutsch. bot. Gesell., **27**: 21-26.
- , 1910. — *Weitere Beiträge zur Embryobildung einiger Euphorbiaceen*. Ber. deutsch. bot. Gesell., **28**: 413-418.
- , 1911. — *Über die anomale Embryosackentwicklung bei Euphorbia palustris L. und anderen Euphorbiaceen*. Ber. deutsch. bot. Gesell., **29**: 430-436.
- MOORE R. J. and LINDSAY D. R., 1953. — *Fertility and Polyploidy of Euphorbia cyparissias in Canada*. Canadian Journ. of Bot., **31**: 152-163.
- , 1958. — *Cytotaxonomy of Euphorbia esula in Canada and its hybrid with Euphorbia cyparissias*. Canadian Journ. of Bot., **36**: 547-559.
- PARLATORE F., 1867. — *Flora italiana*. IV. Euphorbiaceae. Firenze.
- PAX F. e HOFFMANN K., 1931. — *Euphorbiaceae*. Engler & Prantl, Nat. Pflanzenfamilien, **19c**: 11-233.
- PERRY B. A., 1943. — *Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae*. Amer. Journ. of Bot., **30**: 527-543.
- PROKHANOV J. I., 1949. — *Euphorbia*. Flora U.R.S.S. Vol. XIV. Mosqua/Leningrad.
- RÖPER, 1824. — *Enum. Euph.* — Citato da HEGELMAIER 1901.
- SARGANT E., 1896. — *The Formation of the Sexual Nuclei in Lilium Martagon*. Ann. of Bot., **10**: 445-477.
- SCHNARF K., 1936. — *Contemporary understanding of embryo-sac development among angiosperms*. Bot. Rev., **2**: 565-585.
- SCHÜRHOFF P. N., 1924. — *Zytologische Untersuchungen in der Reihe der Geraniales*. Jarb. f. wissensch. Botanik, **63**: 707-759.
- TREUB M. e MELLINK J. F. A., 1880. — *Notice sur le développement du sac embryonnaire dans quelques Angiosperms*. Archiv. Néerland., **15**: 452-457.
- VENTURA M., 1933. — *Sviluppo del gametofito femminile di Euphorbia mauritanica L.* Annali di Botanica, **20**: 267-273.
- , 1940. — *Nuovo contributo alla embriologia delle Euphorbiaceae*. Annali di Botanica, **22**: 42-52.

WENIGER W., 1917. — *Development of embryo sac and embryo in Euphorbia Preslii and E. splendens*. Botanical Gazette, **63**: 266-281.

SUMMARY

The author has observed diploid, triploid and tetraploid biotypes in *Euphorbia dulcis* L.

The diploid biotype collected near to the « Passo dell'Abetone (Pistoia) » is characterized by regular amphimixis and by the following karyotype:

$$z = 2n = 12 = 2M_1 + 2M_2 + 2M_3 + 2M_4 + 2S_1 + 2S_2.$$

Triploid plants coming from different localities, namely « Passo dell'Abetone (Pistoia) », « Buca dell'uomo selvatico (Alpi Apuane, Rifugio della Pietrapana) », « Bosco di Vaiano (Bientina, Pisa) », are characterized by the following karyotype:

$$z = 3n = 18 = 3M_1 + 3M_2 + 3M_3 + 3M_4 + 3S_1 + 3S_2.$$

The tetraploid biotype collected along « Rio San Pantaleone (Monte Pisano) » is characterized by sporophytic embryony (= adventive embryony) and by the following karyotype:

$$z = 4n = 24 = 4M_1 + 4M_2 + 4M_3 + 4M_4 + 4S_1 + 4S_2.$$

The embryo-sac development follows the *Euphorbia dulcis* type (= *Fritillaria* type) as previously described by CARANO (1925, 1926), however few instances of a development according to the *Pyrethrum parthenifolium* 16-nucleate type have also been observed.

RIASSUNTO

L'A., dopo una breve revisione della letteratura, espone i primi risultati di alcune osservazioni compiute su diversi biotipi di *Euphorbia dulcis* L. da lui stesso raccolti in Toscana.

Mette in particolare evidenza l'esistenza:

1) di un biotipo diploide: $z = 2n = 12 = 2M_1 + 2M_2 + 2M_3 + 2M_4 + 2S_1 + 2S_2$, amfimitico senza embrionia sporofitica di origine nucellare (provenienza: Abetone);

2) di un biotipo triploide: $z = 3n = 18 = 3M_1 + 3M_2 + 3M_3 + 3M_4 + 3S_1 + 3S_2$, (provenienza: Abetone, Alpi Apuane, Cerbaie);

3) di un biotipo tetraploide: $z = 4n = 24 = 4M_1 + 4M_2 + 4M_3 + 4M_4 + 4S_1 + 4S_2$, con poliembrionia sporofitica nucellare (provenienza: Monte Pisano).

Il numero cromosomico $2n = 12$ costituisce una riconferma di quello trovato da PERRY (1943). I numeri cromosomici $3n = 18$ e $4n = 24$ sono nuovi per la specie studiata.

L'A. espone inoltre alcune osservazioni sulla costruzione del gametofito femminile e sulla poliembrionia.

Dimostra l'esistenza, accanto a gametofiti costruiti secondo il « tipo *Euphorbia dulcis* » (= « tipo *Fritillaria* »), di gametofiti del « tipo *Pyrethrum parthenifolium* 16-nucleato » e di anomalie concernenti soprattutto la cellularizzazione.

Conferma le osservazioni degli Autori precedenti circa l'origine degli embrioni sporofitici da cellule della nucella, e mette in evidenza che il manifestarsi della poliembrionia sporofitica in *Euphorbia dulcis* L. è in diretto rapporto con fattori genetici, cioè con la poliploidia.

CHROMOSOME STUDIES OF SOME VARIETIES OF *NARCISSUS TAZETTA* L.

ARUN KUMAR SHARMA and ARCHANA SHARMA

Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University, Calcutta, India

Received: 5th October 1960

INTRODUCTION

Extensive work has been done on the genus *Narcissus* by several workers (NAGAO 1929, 1933; PHILP 1934; FERNANDES 1934 - 1951; PEREIRA 1940; MAUGINI 1952, 1953; WYLIE 1952; *vide* DARLINGTON and WYLIE 1955). This genus is specially important because of the variability it presents in its species and species complex. Not only it is constituted of diploids, aneuploids and polyploids but even supernumerary « B » chromosomes have been claimed to exist in certain populations of some species (WYLIE 1952). The species of this genus have been classified by WYLIE (*l.c.*) under three groups, viz. sexually reproducing, clonal hybrids and fertile hybrids.

One of the most important species of this genus is *Narcissus tazetta*, which is so far known to be characterized by $n = 10$ and 11 chromosomes in contrast to $n = 7$ chromosomes of the other species. This genus reproduces sexually too and crosses freely with a number of other species. It may be noted that in addition to sexual reproduction, vegetative propagation too is not uncommon and provides a rapid means of the propagation of individuals.

In India, several varieties of this species are available to horticulturists. In view of the importance of this species which has so far provided with facts of cytological interest, an investigation on varieties available here was thought desirable and thus the present work was initiated.

MATERIALS AND METHODS

Five different varieties of *Narcissus tazetta* were studied in the present set of experiments. They were:

1. *Narcissus tazetta* L. var. *chastity*,
2. *N. tazetta* L. var. *ponterius*,
3. *N. tazetta* L. var. *paper white*,
4. *N. tazetta* L. var. *cheerfulness*,
5. *N. tazetta* L. var. *king daffodil*.

These varieties were obtained through the Chandra Nursery at Rhenock, growing in Sikkim at an altitude of about 5000 feet under temperate conditions. They are evidently horticultural varieties, cultured and maintained by horticulturists for their ornamental value. Their identification was confirmed from the Indian Botanical Garden at Sibpore.

The bulbs were grown in flower pots in a mixture of sawdust and soil in the Calcutta University garden. They were kept in shade.

For the study of somatic chromosomes, healthy young root-tips were cut and treated in different prefixation chemicals, including oxyquinoline, aesculine, coumarin and p-dichlorobenzene (Tjio and LEVAN 1950; SHARMA and BAL 1953; SHARMA and MOOKERJEA 1955; SHARMA and SARKAR 1955). Of these, best results were obtained with one hour treatment in saturated aesculine solution at 10°-12° C. The root-tips were then heated in a mixture of 2% aceto-orcein solution and normal hydrochloric acid (9 : 1) for a few seconds and finally squashed in 1% aceto-orcein solution.

Figures were drawn at a Zeiss microscope with 1.3 N.A. and apochromatic objective and an eyepiece $\times 12$ at a table magnification of $\times 1800$ approximately. In the diagrams, the chromosomes with secondary constrictions have been drawn in outline and the figures have been reduced to half-size in the reproduction.

OBSERVATIONS

The chromosomes of *Narcissus tazetta* are, on an average, long in size, similar to those of the other members of Amaryllidaceae. Size difference in complement is very marked, but not abrupt. The chromosome numbers studied vary from $2n = 14$ in *N. tazetta* var. *ponterius* to $2n = 32$ in *N. tazetta* var. *paper white*. Very often, varying chromosome numbers have been recorded in different cells of the same tissue. In such cases, the number occurring in the largest number of cells within the variety studied has been taken to be its normal chromosome number.

The chromosomes of the different varieties present a gross morphological resemblance. In all, eleven distinct chromosome types can be recorded within the species as a whole, namely:

- Type A* — Very long chromosome, longest in the set, with nearly subterminal primary constriction.
- Type B* — Long chromosome with two constrictions, primary and secondary, one median and the other nearly median in position, placed rather close to each other.
- Type C* — Long to nearly medium sized chromosome with two constrictions, primary and secondary, located at nearly submedian positions at the two opposite ends of the chromosome. The middle segment is much longer than the end ones.

- Type D* — Long chromosome with two constrictions, primary and secondary, one nearly median in position and the other located in the middle of the slightly shorter arm.
- Type E* — Long chromosome with median to nearly median primary constriction.
- Type F* — Long chromosome, shorter than A, with submedian to nearly submedian primary constriction.
- Type G* — Medium-sized chromosome with two constrictions, primary and secondary, one nearly median to nearly submedian in position and the other subterminal at the distal end of the shorter arm.
- Type H* — Medium-sized chromosome with two constrictions, primary and secondary, one median and the other submedian in position.
- Type I* — Medium-sized chromosomes with median to submedian primary constrictions.
- Type J* — Nearly short chromosome with median primary constriction and a satellite at the distal end of one the arms.
- Type K* — Comparatively short chromosome with median to nearly median primary constriction.

The different varieties differ in having different combinations of the above types. Each variety can be identified by different numbers of the various types present in it.

A detailed description of the somatic complements of the five varieties studied, is given below.

« *Narcissus tazetta* » *L. var. « chastity »* ($2n = 30$).

Thirty chromosomes are present in the normal somatic complement. Size difference is very marked, ranging from $3,2\mu$ to $15,4\mu$. Six chromosomes bear secondary constrictions (Figs. 1 and 1a).

The complement contains one pair of A, one pair of C, one pair of D, three pairs of F, one pair of H, five pairs of I and three pairs of K type of chromosomes. The C pair is much shorter than the D and F chromosomes. The H pair is slightly shorter than the longer I chromosomes. There is an abrupt size difference between I and K chromosomes.

In addition to the normal set described above, nuclei with thirty-six, thirty-one and twenty-eight chromosomes are also on record.

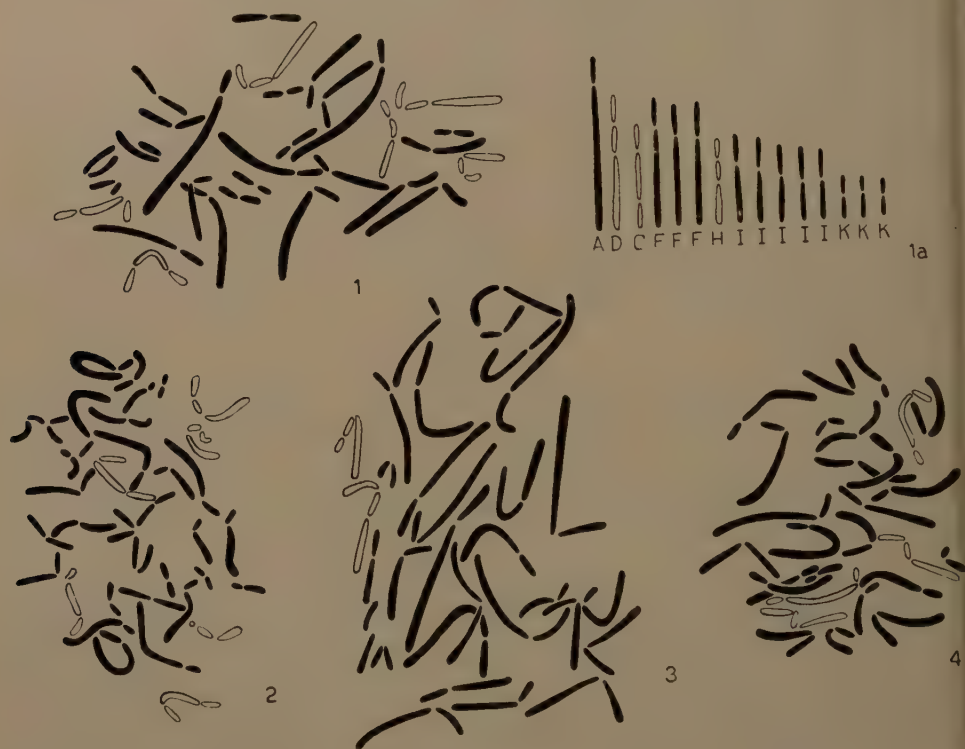
The nucleus with $2n = 36$ chromosomes (Fig. 2) bears six A, two B, three C, two F, one G and the remaining I and K type chromosomes.

The cell with $2n = 31$ chromosomes contains four A, one B, two E, six F, one D and the remaining I and K type of chromosomes (Fig. 3). The plate with

twenty-eight chromosomes bears two A, two B, two C, four E, four F and the rest I and K type of chromosomes (Fig. 4).

« *Narcissus tazetta* » var. « *ponterius* » ($2n = 14$).

Fourteen chromosomes are observed in the normal somatic set. Size difference is marked, ranging from 4.7μ to 13.3μ . Three chromosomes bear secondary constrictions (Figs. 5 and 5a).



Figs. 1, 1a, 2, 3 and 4. — *Narcissus tazetta* var. *chastity* ($2n = 30$): normal somatic metaphase, idiogram and variation nuclei with 36, 31 and 28 chromosomes respectively.

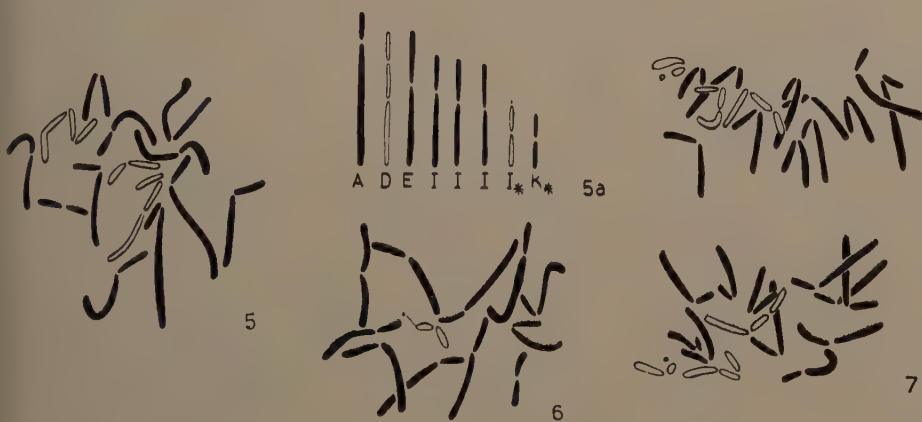
One pair of A, one pair of D, one pair of E, three pairs of I and one *individual* each of J and K type of chromosomes are present in the complement. The D and E types are of the same size. The characteristic feature is the presence of two non-homologous chromosomes of entirely different types, J and K. In anaphase, these two chromosomes split and divide normally (Fig. 7).

A variation nucleus with twelve chromosomes (Fig. 6) shows two A, eight I, one J and one K chromosomes.

« *Narcissus tazetta* » var. « *paper white* » ($2n = 32$).

The normal nuclei contain thirty-two chromosomes. Size difference is very marked, ranging from 3.5μ to 14.4μ and the chromosomes form a graded series. Eight chromosomes bear secondary constrictions (Figs. 8 and 8a).

In the complement, three pairs of A, one pair of B, one pair of D, one pair of E, one pair of G, four pairs of I, one pair of J and four pairs of K type of



Figs. 5, 5a, 6 and 7. — *N. tazetta* var. *ponterius* ($2n = 14$): normal somatic metaphase, idiogram and variation nucleus with 12 chromosomes and anaphase showing normal separation of two non-homologous chromosomes respectively (vide text).

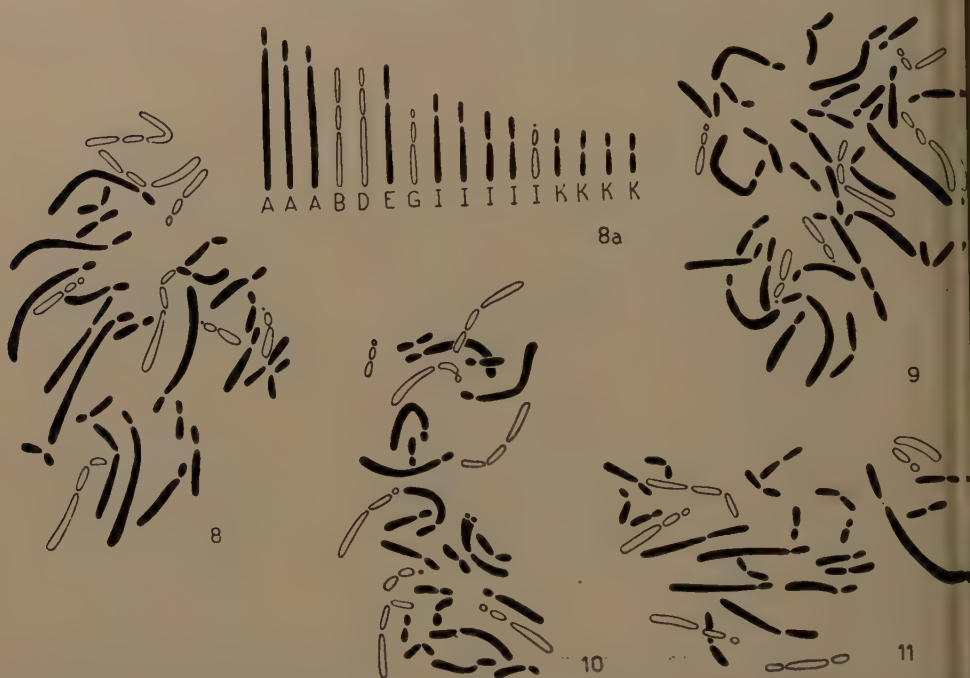
chromosomes are present. The A chromosomes form a graded series. The G pair is rather short and even shorter than the longer I pairs. In the J pair, the primary constrictions are nearly median in position.

Variation nuclei with thirty-six, twenty-nine and twenty-six chromosomes have been recorded.

In the plate with $2n = 36$ (Fig. 9), four A, two D, four F, two G, two J and the rest I and K type of chromosomes are present. The cell with $2n = 29$ (Fig. 10) contains three A, three D, two E, two F, three long G, two J and the remaining I and K chromosomes. The nucleus with $2n = 26$ (Fig. 11) differs from the normal set in having one A, one short C, one D, one E, three F, three G and the rest I and K chromosomes.

« *Narcissus tazetta* » var. « *cheerfulness* » ($2n = 24$).

Twenty-four chromosomes are observed in the normal somatic nucleus. The chromosomes are much shorter than those of the other varieties studied here.



Figs. 8, 8a, 9, 10 and 11. — *N. tazetta* var. *paper white* ($2n = 32$): normal somatic metaphase idiogram and variation nuclei with 36, 29 and 26 chromosomes respectively.

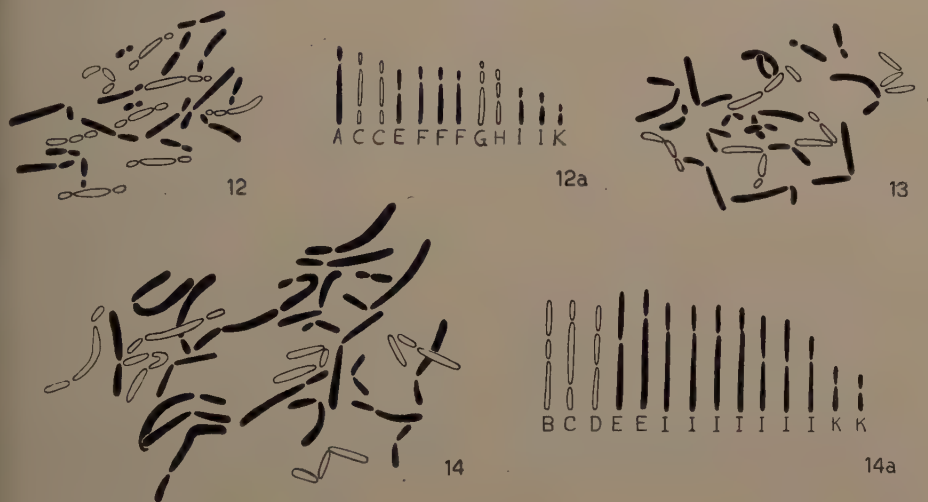
Size difference is present, ranging from 1.8μ to 7μ . Eight chromosomes bear secondary constrictions (Figs. 12 and 12a).

The complement is composed of, one pair of A, two pairs of C, one pair of E, three pairs of F, one pair of G, one pair of H, two pairs of I and one pair of K chromosomes. The A pair is short as compared with the other varieties. One C pair is slightly shorter than the other. The E pair is shorter than the F, G and H. The G chromosomes are rather long and longer than E and F. The H pair is as long as the F.

A variation nucleus with twenty chromosomes has also been observed (Fig. 13). In it, two E, six F, three G, two H and the rest I and K chromosomes are observed. It also shows minor structural alterations in the different types.

« *Narcissus tazetta* » var. « *king daffodil* » ($2n = 28$).

In the somatic cells, twenty-eight chromosomes have been observed (Figs. 14 and 14a). Size difference is present, ranging from 3.5μ to 10.5μ . The long and medium-sized types grade into each other. Six chromosomes bear secondary constrictions.



Figs. 12, 12a and 13. — *N. tazetta* var. *cheerfulness* ($2n = 24$): normal somatic metaphase, idiogram and variation nucleus with 20 chromosomes respectively.

Figs. 14 and 14a. — *N. tazetta* var. *king daffodil* ($2n = 28$): normal somatic metaphase and idiogram respectively.

A detailed analysis of the chromosomes shows the presence of one pair of B, one pair of C, one pair of D, one pair of E, one pair of F, seven pairs of I and two pairs of K type of chromosomes. The B, C and D chromosomes are as long as the longer I chromosomes and shorter than the E and F pairs. The I chromosomes grade in size.

DISCUSSION

The observations on different varieties of *Narcissus tazetta*, described in the text, show the presence of different numbers of chromosomes, such as 14, 24, 28, 30 and 32 in their somatic complements. Of these, only the variety « *chastity* », having thirty chromosomes in the diploid set, may belong to the same line as the series with $n = 10$ chromosomes, reported previously. Fourteen

and twenty-eight chromosomes in the somatic sets of varieties « *ponterius* » and « *king daffodil* » respectively are unusual for this species in the sense that the absence of this number in *N. tazetta*, according to WYLIE (1952) distinguishes it from the other species of this genus.

A significant feature in all the varieties of *N. tazetta* studied here is the occurrence of chromosomal abnormalities in the somatic cells. Such irregularities include both structural and numerical alterations of chromosomes. This behaviour is specially characteristic of those species which propagate through vegetative means. It may be noted that though *N. tazetta* is sexually fertile, yet all the varieties in our collection propagate at the same time profusely through vegetative means. As such, it is possible for these somatic alterations to participate in the formation of new daughter shoots, even though they may be eliminated in the germinal line. In that case, the different varieties of *N. tazetta* studied here, differing in the structure or number of chromosomes may be supposed to have originated through somatic mutation as found in numerous other vegetatively propagated plants (*vide* SHARMA 1956). Direct evidence should be obtained of this indirect indication.

The occurrence of fourteen and twenty-eight chromosomes in the diploid cells in varieties of *N. tazetta*, as observed here, evidently bring this species closer to others of the genus having $n = 7$ chromosomes.

It may be argued that these varieties may have originated through hybridization, with *N. tazetta* as one of the parents. But, in view of the information so far obtained, they may be regarded as somatic mutants from *N. tazetta*. Even if it is considered as a somatic mutant of a hybrid of *N. tazetta*, the occurrence of $2n = 14$ chromosomes in some varieties irrevocably links them with other species of *Narcissus*.

REFERENCES

- DARLINGTON C. D. and WYLIE A. P., 1955. — *Chromosome atlas of flowering plants*. George Allen and Unwin Ltd., London.
- FERNANDES A., 1934. — *Nouvelles études caryologiques sur le genre Narcissus L.* Bol. Soc. Brot., **11**: 3-201.
- , 1937. — *Le problème de Narcissus tazetta L. Les formes à 22 chromosomes somatiques.* Bol. Soc. Brot., **12**: 159-219.
- , 1939. — *Sur la caryo-systématique du groupe Jonquilla du genre Narcissus L.* Bol. Soc. Brot., **13**: 487-544.
- , 1945. — *Sobre a origem de Narcissus Johnstonii Pugsley.* Am. Jard. Bot. Madrid, **6**: 145-158.
- , 1947. — *Summary of work on the cytology of Narcissus L.* R.H.S. Daffodil and Tulip Year Book, **13**: 26-34.
- , 1950. — *La méiose chez Narcissus poetaz, « Alsace ».* Genet. Iber., **2**: 149-174.
- , 1951. — *Sur la phylogénie des espèces du genre Narcissus L.* Bol. Soc. Brot., **25**: 113-190.

- MAUGINI E., 1952. — *Osservazioni carilogiche su Narcissus italicus Ker. Gawl. (Amaryllidaceae)*. Caryologia, **5**: 101-112.
- , 1953. — *Citosistemica di alcuni Narcissus della flora italiana appartenenti alla Sect. Hermione*. Caryologia, **5**: 313-341.
- NAGAO S., 1929. — *Caryological studies of the Narcissus plant. I. Somatic chromosome numbers of some garden varieties and meiotic phases*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ., Ser. B, **4**: 175-198.
- , 1933. — *Number and behaviour of chromosomes in the genus Narcissus*. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ., Ser. B, **8**: 81-200.
- PEREIRA A. DE L., 1940. — *Sobre a carilogia de Narcissus odoratus L. e N. gracilis Sab.* Bol. Soc. Brot., **14**: 67-96.
- PHILP J., 1934. — *Narcissus chromosome numbers*. R.H.S. Daffodil Year Book, **5**: 52-53.
- SHARMA A. K., 1956. — *A new concept of a means of speciation in vegetatively propagating plants*. Caryologia, **9**: 93-130.
- SHARMA A. K. and BAL A. K., 1953. — *Coumarin in chromosome analysis*. Stain Techn., **28**: 255-259.
- SHARMA A. K. and MOOKERJEE A., 1955. — *Paradichlorobenzene and other chemicals in chromosome work*. Stain Techn., **30**: 1-7.
- SHARMA A. K. and SARKAR S., 1955. — *A new technique for the study of chromosomes of Palms*. Nature, **176**: 261.
- TJIO J. H. and LEVAN A., 1950. — *The use of oxyquinoline in chromosome analysis*. Anal. Estac. Exp. de Aula Dei, **2**: 21-64.
- WYLIE A. P., 1952. — *The history of the garden Narcissi*. Heredity, **6**: 137-156.

SUMMARY

Five East Himalayan varieties of *Narcissus tazetta* L. were investigated, namely:

1. *N. tazetta* var. « *chastity* » ($2n = 30$).
2. *N. tazetta* var. « *ponterius* » ($2n = 14$).
3. *N. tazetta* var. « *paper white* » ($2n = 32$).
4. *N. tazetta* var. « *cheerfulness* » ($2n = 24$).
5. *N. tazetta* var. « *king daffodil* » ($2n = 28$).

A thorough karyotype analysis been performed of all these types. The importance of both structural and numerical alterations of chromosomes in the evolution of species has been pointed out.

The occurrence of $2n = 14$ in variety « *ponterius* » of *N. tazetta*, so far not recorded in this species, brings it closer to the other species of *Narcissus*.

Inconstancy in chromosome complements in the somatic tissue is present and as such, the role of somatic mutation in speciation has been emphasized.

RIASSUNTO

Sono state studiate cinque varietà Est-Himalayane di *Narcissus tazetta* L. e cioè:

1. *N. tazetta* var. « *chastity* » ($2n = 30$).
2. *N. tazetta* var. « *ponterius* » ($2n = 14$).
3. *N. tazetta* var. « *paper white* » ($2n = 32$).
4. *N. tazetta* var. « *cheerfulness* » ($2n = 24$).
5. *N. tazetta* var. « *king daffodil* » ($2n = 28$).

È stata compiuta un'analisi cariotipica completa di tutte queste varietà. È stata messa in luce l'importanza nell'evoluzione della specie delle alterazioni dei cromosomi, sia strutturali sia numeriche.

La presenza nella varietà « *ponterius* » di $2n = 14$, numero fino ad oggi mai trovato in *N. tazetta*, avvicina questa specie alle altre del genere *Narcissus*.

Incostanza nei cariogrammi è presente nei tessuti somatici e, pertanto, viene messo in luce il ruolo delle mutazioni somatiche nella speciazione.

A MODIFIED ACETO-ORCEIN METHOD FOR POLLEN MOTHER CELLS

CANIO G. VOSA

Botany School, University of Oxford, Oxford, Great Britain

Received: 10th February 1961

The methods of staining botanical material have shown a remarkable improvement since the adaptation of the Schiff reagent for cytological work by FEULGEN and ROSSENBECK in 1924 and the perfecting of the squash method by HETZ in 1936.

The Feulgen stain is very effective for root-tips, endosperms, Pollen Grain etc., but its utility is somewhat reduced in staining Pollen Mother Cells.

For the resolution of chiasmata in prophase, metaphase I and other stages of meiosis the Feulgen stain is not the best. By the very fact that its functioning is based on hydrolysis at 60° C for a variable amount of time, the fine internal chromosome structure is damaged and at metaphase I the chiasmata are hardly discernible.

Also the use of aceto-carmine, with iron acetate as mordant seems to be far from perfect, requiring a long time for a satisfactory brilliancy of coloration.

Aceto-orcein used as suggested by LA COUR in 1941 is considered to be the best for cytological work on Pollen Mother Cells and Pollen Grain but there again as with acetocarmine the process of staining is long.

I have accordingly experimented with different concentrations of orcein in acetic acid in order to shorten the time of staining. The best concentration I have found to be 1.5% in 45% acetic acid. Since the solution is liable to deteriorate in keeping, the stain is best kept in glacial acetic acid.

The solution is prepared as follows:

Dissolve by gentle boiling 3.3 grams of
orcein in 100 c.c. of glacial acetic acid
for 12 hours, using a reflux condenser.

The solution obtained is diluted to 45% with glass distilled water when required. In order to improve fixation a few drops of chloroform may be added to the working solution.

The schedule of treatment that I recommend is the one suggested by DARLINGTON and LA COUR in *The Handling of Chromosomes* (1960) p. 153, for permanent stain fixation.

After squashing a satisfactory staining is reached in about twenty minutes.

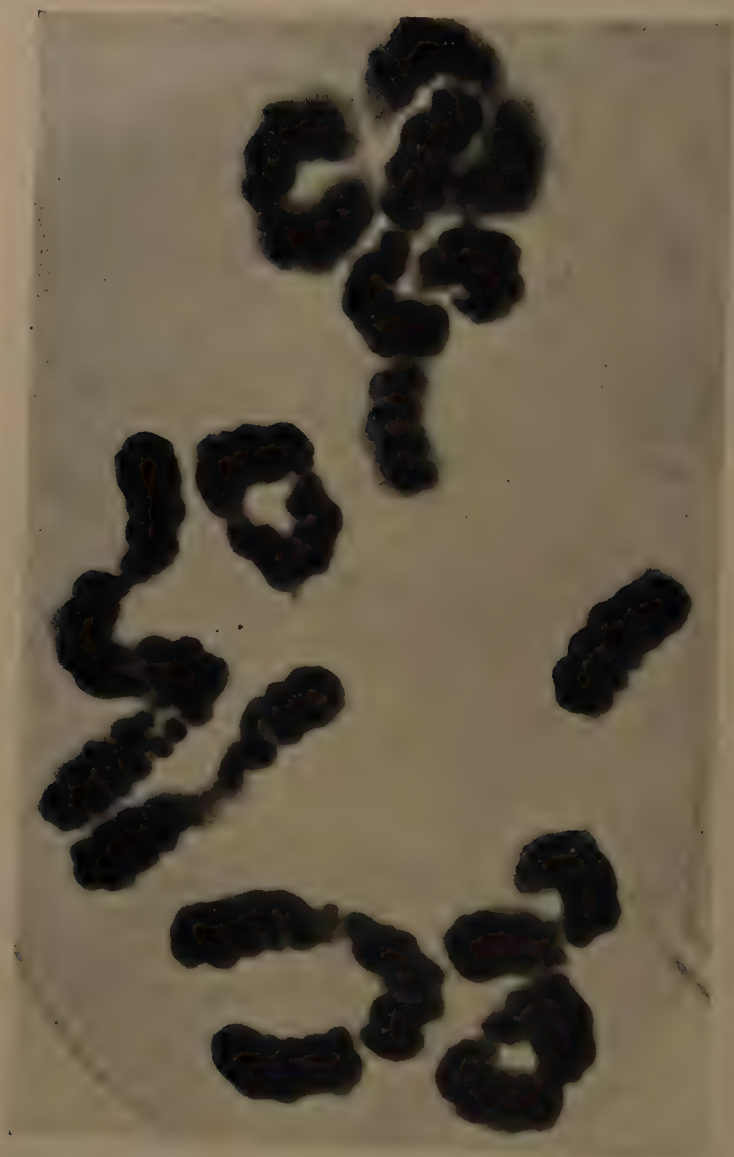


Fig. 1. — Pollen Mother cell of tetraploid *Tradescantia Virginiana* ($4n = 24$) showing one univalent, one rod and three ring bivalents, one trivalent and three quadrivalents. The number of chiasmata is 19, all of which are terminal. $\times 2,740$.

The preparation can be made permanent following the schedule suggested or the cover slip can be ringed with a rubber solution (Holtite is by far the best for this purpose) and treated as semi-permanent.



Fig. 2. — Pollen Mother Cell of diploid *Tradescantia bracteata* ($2n = 12$) showing three rod bivalents and tree ring bivalents with 9 terminal chiasmata. $\times 3,200$.

The results of this method are very satisfactory as shown by the figures 1 and 2. The major coils of the chromosomes are clearly visible and so is the chiasma morphology.

REFERENCES

- DARLINGTON C. D. and LA COUR L. F., 1960. — *The handling of chromosomes*. Allen and Unwin Ltd., London.
- FEULGEN R. and ROSSENBECK H., 1924. — *Microscopisch-chemische Nachweis Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure*. Hoppe-Zeil Zeit., **135**: 203-248.
- HEITZ E. 1936. — *Die Nucleal-Quetschmethode*. Ber. Deut. Bot. Ges., **53**: 870-878.
- LA COUR L., 1941. — *Acetic-Orcein*. Stain Techn., **16**: 169-174.

RIASSUNTO

Viene riferito su un nuovo metodo per la preparazione permanente e semi-permanente delle Cellule Madri del Polline usando orceina acetica. La concentrazione di orceina in acido acetico al 45% è aumentata all'1,5%. Viene suggerito inoltre l'uso di cloroformio per completare la fissazione.

CONTRIBUTO ALLA CARIOLOGIA DEL GENERE *EUCALYPTUS* (MYRTACEAE)

CECILIA RUGGERI

Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale dell'E.N.C.C., Sezione di Biologia, Roma

In Redazione: il 5 Ottobre 1960

INTRODUZIONE

Quanto oggi conosciamo intorno alla cariologia del genere *Eucalyptus* — e sono notizie piuttosto frammentarie, per la difficoltà che il soggetto oppone ad uno studio più intenso — si deve alle ricerche di SUGUIRA (1936), SMITH-WHITE (1942-1950), ATCHISON (1947), KRUG e SILVEIRA ALVES (1949) e RUGGERI (1959-60).

In base alle suddette ricerche si è visto che questo genere presenta cariolologicamente un notevole grado di affinità ed omogeneità — donde la ben nota grande facilità di ibridazione — ma è particolarmente inadatto per uno studio qualitativo oltre che quantitativo, data la piccolezza e la poca colorabilità dei cromosomi, che lo rendono assai difficoltoso.

Si comprende, quindi, come la conoscenza cariologica di questo genere sia ancora piuttosto superficiale e si limiti quasi esclusivamente al rilievo quantitativo del corredo cromosomico.

I biotipi finora studiati posseggono il cariotipo fondamentale della specie $2n = 22$. Fanno eccezione a questo numero *Eucalyptus cladocalyx*, *E. redunca* ed *E. flocktoniae*, che presentano un numero apparentemente aneuploide $2n = 24$ (ATCHISON 1947; RUGGERI 1960).

Nel corso delle nostre ricerche, nell'intento di portare un nuovo contributo alla conoscenza cariologica di questo genere, abbiamo esaminato 27 specie di *Eucalyptus*, che elenchiamo secondo la classificazione di BLAKELY (1955), e precisamente:

MACRANTHERAE

| | | |
|--------------------------------|-----------------------|----------------------|
| <i>E. botryodes</i> Sm. | provenienza del seme: | Italia |
| <i>E. × trabutii</i> Vilmorin | » » » | Italia |
| <i>E. cornuta</i> Labill. | » » » | Australia Occ. |
| <i>E. lehmannii</i> Preiss. | » » » | Africa del Sud |
| <i>E. gomphocephala</i> DC. | » » » | Marocco |
| <i>E. occidentalis</i> Endl. | » » » | Francia |
| <i>E. astringens</i> Maiden | » » » | Marocco e Australia |
| <i>E. cladocalyx</i> F. Muell. | » » » | Africa del Sud |
| <i>E. tereticornis</i> Sm. | » » » | Marocco e Portogallo |
| <i>E. camaldulensis</i> Dehn. | » » » | Italia |
| <i>E. ovata</i> Labill. | » » » | Australia Occ. |

| | | | |
|---|-------------|-----------|----------------------|
| <i>E. aggregata</i> Deane & Maiden | provenienza | del seme: | Australia |
| <i>E. bridgesiana</i> R. T. Baker | » | » | Africa del Sud |
| <i>E. elaeophora</i> F. Muell. | » | » | Australia |
| <i>E. dalrympleana</i> Maiden | » | » | Australia |
| <i>E. bicostata</i> Maiden, Bl. & Simm. | » | » | Italia |
| <i>E. maidenii</i> F. Muell. | » | » | Sud Africa e Francia |
| <i>E. gonioocalyx</i> F. Muell. | » | » | Australia |
| <i>E. macarthuri</i> Deane & Maiden | » | » | Argentina |
| <i>E. cinerea</i> F. Muell. | » | » | Argentina |

RENANTHERAE

| | | | |
|------------------------------------|---|---|-----------|
| <i>E. fastigata</i> Deane & Maiden | » | » | Australia |
|------------------------------------|---|---|-----------|

PORANTHEROIDEAE

| | | | |
|----------------------------------|---|---|----------------|
| <i>E. albens</i> Miq. | » | » | Australia |
| <i>E. melanophloia</i> F. Muell. | » | » | Africa del Sud |

TERMINALES

| | | | |
|--------------------------------|---|---|----------------------|
| <i>E. leucoxylon</i> F. Muell. | » | » | Nuova Galles del Sud |
| <i>E. polyanthemus</i> Schauer | » | » | Nuova Galles del Sud |

PLATYANTHERAE

| | | | |
|----------------------------------|---|---|-----------|
| <i>E. flocktoniae</i> Maiden | » | » | Australia |
| <i>E. brockwayi</i> C. A. Gardn. | » | » | Australia |

Abbiamo preso in considerazione *E. camaldulensis* ed *E. botryoides*, già studiati da ARCHISON (1947), per un esame comparativo con *E. × trabutii*, ibrido naturale tra le due specie. Un ulteriore controllo abbiamo effettuato su *E. cladocalyx* ed *E. bridgesiana* (= *E. stuartiana*), anche essi studiati in precedenza da ARCHISON (1947).

MATERIALE E METODO

La tecnica adoperata per ottenere piastre metafasiche leggibili è stata la seguente: pretrattamento con colchicina allo 0,2% per tre ore circa degli apici radicali di giovani plantule, sviluppatesi in capsule Petri alla temperatura di 20°-22°, da seme proveniente dalle località riportate a lato; fissaggio per qualche minuto in Carnoy modificato; preidrolisi a freddo per tre minuti con una miscela in parti uguali di acido cloridrico concentrato ed alcool a 95°; idrolisi a caldo per otto minuti in una soluzione di acido cloridrico al 10%; colorazione con fucsina basica decolorata secondo la tecnica dello « striscio al Feulgen ».

RISULTATI

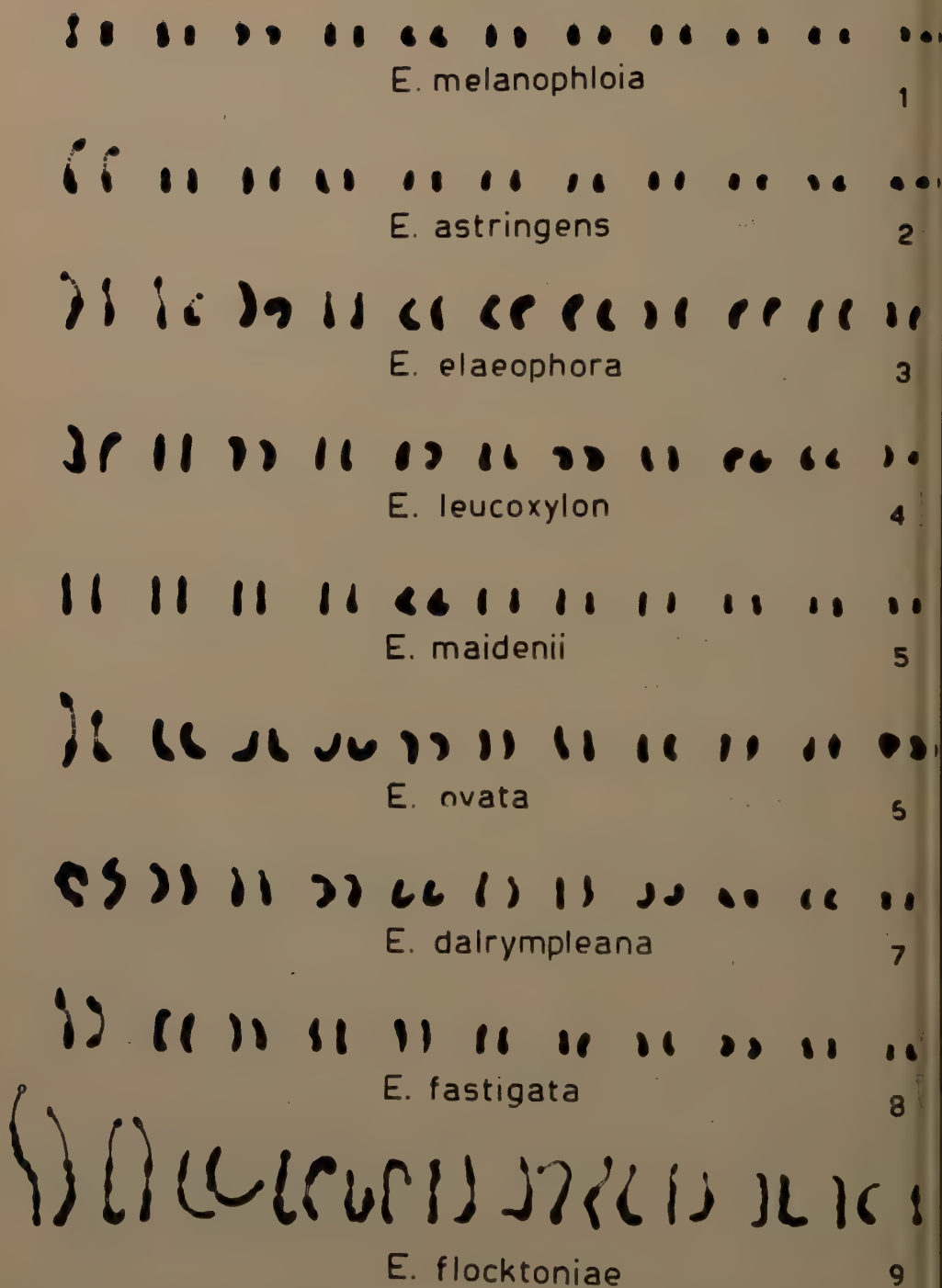
Nelle specie esaminate ho riscontrato la seguente situazione kariologica:

| | |
|---|-------------------------------|
| <i>E. botryoides</i> Sm. | $2n = 22^*$ |
| <i>E. trabutii</i> Vilmorin | $2n = 22$ |
| <i>E. cornuta</i> Labill. | $2n = 22$ |
| <i>E. lehmannii</i> Preiss. | $2n = 22$ (Fig. 15) |
| <i>E. gomphocephala</i> DC. | $2n = 22$ |
| <i>E. occidentalis</i> Endl. | $2n = 22$ (Fig. 19) |
| <i>E. astringens</i> Maiden | $2n = 22$ (Figg. 2 e 21) |
| <i>E. cladocalyx</i> F. Muell. | $2n = 24^*$ (Figg. 12 e 31) |
| <i>E. tereticornis</i> Sm. | $2n = 22$ (Fig. 16) |
| <i>E. camaldulensis</i> Dehn. | $2n = 22^*$ |
| <i>E. ovata</i> Labill. | $2n = 22$ (Figg. 6 e 27) |
| <i>E. aggregata</i> Deane & Maiden | $2n = 22$ (Figg. 11 e 30) |
| <i>E. bridgesiana</i> R. T. Baker | $2n = 22^*$ |
| <i>E. elaeophora</i> F. Muell. | $2n = 22$ (Figg. 3 e 22) |
| <i>E. dalrympleana</i> Maiden | $2n = 22$ (Figg. 7 e 28) |
| <i>E. bicostata</i> Maiden, Bl. & Simm. | $2n = 22$ |
| <i>E. maidenii</i> F. Muell. | $2n = 22$ (Figg. 5 e 24) |
| <i>E. goniocalyx</i> F. Muell. | $2n = 22$ (Figg. 13 e 29) |
| <i>E. macarthuri</i> Deane & Maiden | $2n = 22$ (Fig. 14) |
| <i>E. cinerea</i> F. Muell. | $2n = 22$ |
| <i>E. fastigata</i> Deane & Maiden | $2n = 22$ (Fig. 8) |
| <i>E. albens</i> Miq. | $2n = 22$ (Fig. 17) |
| <i>E. melanophloia</i> F. Muell. | $2n = 22$ (Figg. 1 e 20) |
| <i>E. leucoxylon</i> F. Muell. | $2n = 22$ (Figg. 4 e 23) |
| <i>E. polyanthemos</i> F. Muell. | $2n = 22$ (Fig. 18) |
| <i>E. flocktoniae</i> Maiden | $2n = 24$ (Figg. 9, 32 e 33) |
| <i>E. brockwayi</i> C. A. Gardn. | $2n = 22$ (Figg. 10, 25 e 26) |

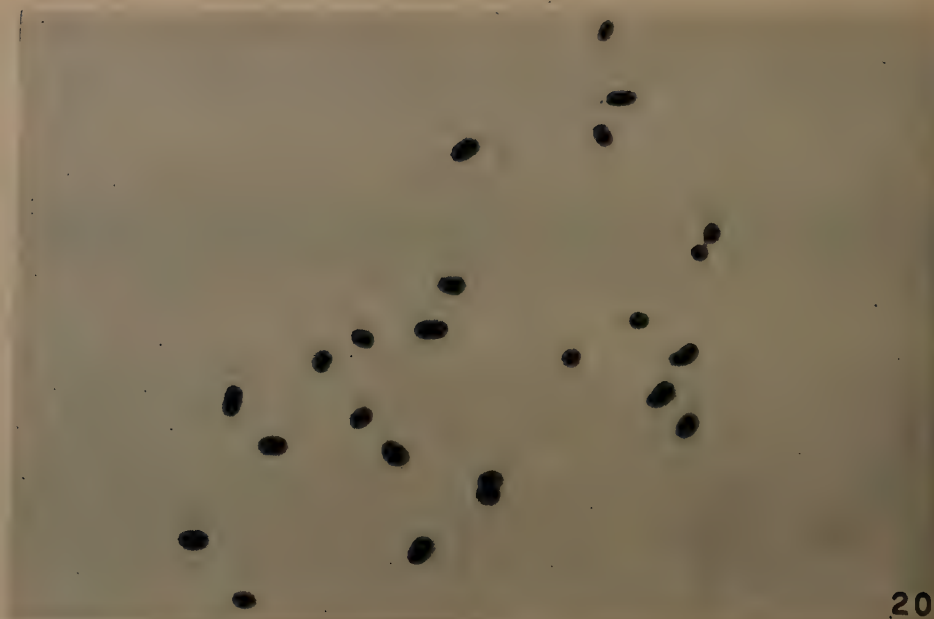
Ad eccezione di *E. cladocalyx*, del resto già studiata da ARCHISON (1947) e di *E. flocktoniae*, presentanti $2n = 24$, tutte le specie esaminate sono caratterizzate da $2n = 22$ nelle cellule somatiche.

Non sempre il contenuto citoplasmatico, il più delle volte denso e scuro, consente una buona osservazione. I cromosomi appaiono generalmente molto piccoli, quasi sempre poco colorabili, spesso ammassati. Non presentano differenze notevoli d'ordine morfologico, anche se talvolta, forse dovute al diverso grado di contrazione metafasica, si apprezzano differenze di dimensione dei cromosomi delle diverse specie.

* Già studiati da ARCHISON (1947), che riscontrò per *E. cladocalyx* $2n = 24$ e per gli altri $2n = 22$; ho anch'io riscontrato lo stesso numero di cromosomi.



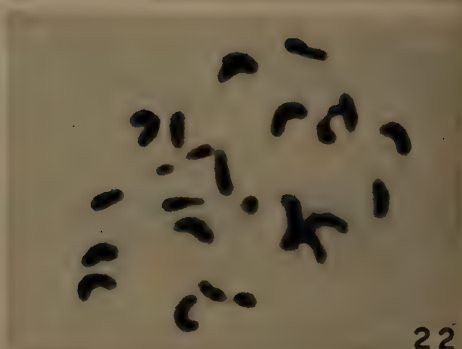
Figg. 1-19. — Cariogrammi del genere *Eucalyptus*. I cromosomi sono ordinati secondo la lunghezza $\times 4000$.



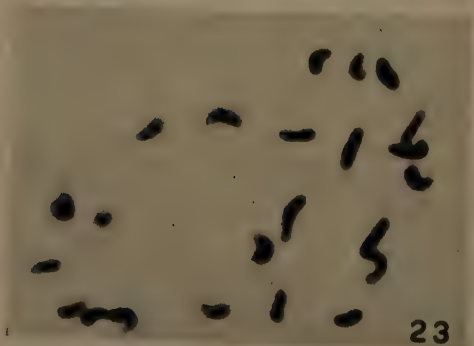
20



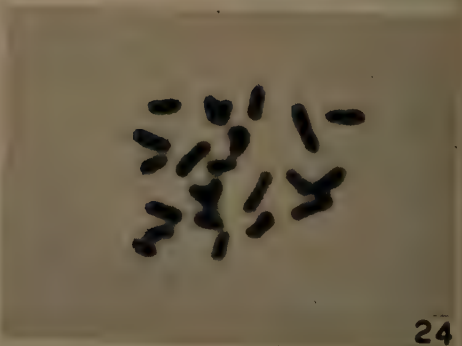
21



22



23



24

- Fig. 20. — Metafase in apice radicale di *Eucalyptus melanophloia*; $\times 4000$.
 Fig. 21. — Metafase in apice radicale di *E. astringens*; $\times 4000$.
 Fig. 22. — Metafase in apice radicale di *E. elaeophora*; $\times 4000$.
 Fig. 23. — Metafase in apice radicale di *E. leucoxylon*; $\times 4000$.
 Fig. 24. — Metafase in apice radicale di *E. maidenii*; $\times 4000$.



Figg. 25 e 26. — Metafase e prometafase in apici radicali di *Eucalyptus brockwayi*; $\times 4000$.

Fig. 27. — Metafase in apice radicale di *E. ovata*; $\times 4000$.

Fig. 28. — Metafase in apice radicale di *E. dalrympleana*; $\times 4000$.

Fig. 29. — Metafase in apice radicale di *E. goniocalyx*; $\times 4000$.

Fig. 30. — Prometafase in apice radicale di *E. aggregata*; $\times 4000$.

Qualche interessante osservazione cariológica è possibile fare confrontando l'aspetto presentato dai cromosomi nello stadio di prometafase con quello che essi assumono alla metafase. Mentre nel secondo caso poco o nulla si può rilevare circa la morfologia cromosomica, se non la posizione del centromero, mediano o sub-

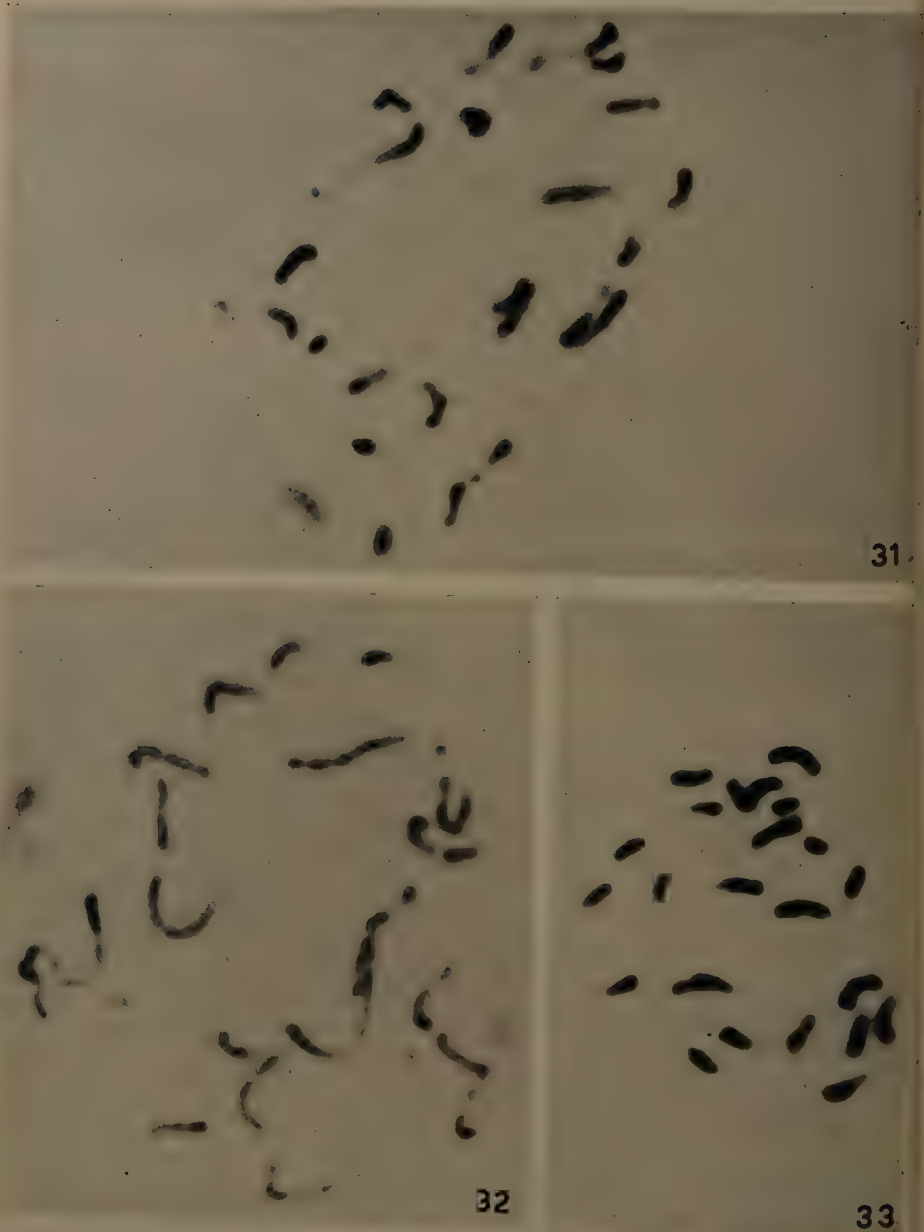


Fig. 31. — Prometafase in apice radicale di *Eucalyptus cladocalyx*; $\times 4000$.
 Figg. 32 e 33. — Prometafase e metafase in apici radicali di *E. flocktoniae*; $\times 4000$.

mediano e determinante spesso un lungo tratto acromatico, nel primo caso, invece, oltre ad una maggiore lunghezza dei cromosomi, quasi sempre si pos-

sono notare anche 2 o più costrizioni secondarie. Tali costrizioni individuano spesso satelliti puntiformi, la cui presenza non è più possibile riscontrare nello stadio di metafase (Figg. 25, 26, 32 e 33).

A proposito delle costrizioni secondarie dobbiamo subito dire che esse sembrano essere di due tipi e cioè o ben visibili e più o meno allungate, oppure appaiono come strozzature di minore entità che si ripetono nel cromosoma in tutta la sua lunghezza, conferendogli il caratteristico aspetto « a coroncina ».

Dal confronto dei vari cariogrammi, risulta evidente la notevole somiglianza nelle linee generali dei corredi cromosomici; questa fondamentale uniformità di morfologia è determinata principalmente dalla posizione del centromero e dal numero e dalla posizione delle costrizioni secondarie, nonché dalle differenze nella lunghezza complessiva dei cromosomi. Per quanto riguarda la lunghezza, si possono individuare, nelle specie studiate, tre categorie e cioè quelle a cromosomi grandi, medi e piccoli.

Alla prima categoria appartengono senz'altro le due specie a 24 cromosomi, i cui cariogrammi presentano una notevole analogia. Entrambe le specie, infatti, presentano due coppie a cromosomi molto lunghi, in cui una costrizione secondaria individua un satellite puntiforme.

In definitiva, nonostante la grande costanza ed omogeneità e le difficoltà opposte ad uno studio più approfondito dal genere *Eucalyptus*, ci sembra che un piccolo passo avanti sia stato fatto per quello che riguarda la morfologia cromosomica.

BIBLIOGRAFIA

- ATCHISON E., 1947. — *Chromosome numbers in the Myrtaceae*. Amer. Journ. Bot., **34**: 159-164.
- BLAKELY W. F., 1955. — *A Key to the Eucalypts*. 2nd Ed. Forestry and Timber Bureau, Canberra.
- DARLINGTON C. D. and WYLIE F. D., 1955. — *Chromosome atlas of flowering plants*. Allen & Unwin Ltd., London.
- KRUG C. A. and SILVEIRA ALVES A., 1949. — *Eucalyptus Improvement*. Journ. Hered., **40**: 133-139; 143-149.
- MC AULAY A. L. and CRUICKSHANK F. D., 1937. — *The male meiotic cycle in the genus Eucalyptus*. Papers and Proc. Roy. Soc. Tasmania, **1937**: 41-44.
- MESSERI A. e RUGGERI C., 1959. — *Il numero cromosomico di Eucalyptus × trabutii Vilmorin (Myrtaceae)*. Proc. IX Int. Bot. Congr. Abs.
- RUGGERI C., 1960. — *Il numero cromosomico di Eucalyptus × trabutii Vilmorin (Myrtaceae)*. Pubbl. Centro Sperim. Agric. For., **4**: 39-44.
- , 1960. — *Primo contributo alla conoscenza cariologica del genere Eucalyptus (Myrtaceae)*. Pubbl. Centro Sperim. Agric. For., **4**: 121-126.
- , 1960. — *Secondo contributo alla conoscenza cariologica del genere Eucalyptus (Myrtaceae)*. Pubbl. Centro Sperim. Agric. For., **4**: 139-150.
- , 1960. — *Il numero cromosomico di Eucalyptus flocktoniae Maiden (Myrtaceae)*. Pubbl. Centro Sperim. Agric. For., **4**: 165-176.
- MITH-WHITE S., 1942. — *Cytological studies in the Myrtaceae. I. Microsporogenesis in several genera of tribe Leptospermoideae*. Proc. Linn. Soc. New South Wales, **67**: 335-342.

SUGUIRA T., 1936. — *Studies on the chromosome numbers in higher plants, with special reference to cytokinesis*. I. Cytologia, 7: 544-595.

SUMMARY

The chromosome number has been determined for 27 species of *Eucalyptus*. With the exception of *E. cladocalyx* (ATCHISON 1947) and *E. flocktoniae*, having a number of $2n = 24$, all the species examined show a constant diploid number of $2n = 22$. Some comparisons have been made between the chromosomes in the prometaphase and in metaphase. However the chromosome set is very similar for all species in the genus *Eucalyptus*, and this character is not of much help in elucidating their morphology.

RIASSUNTO

È stato determinato il numero cromosomico somatico di 27 specie di *Eucalyptus*. Ad eccezione di *E. cladocalyx* (ATCHISON 1947) ed *E. flocktoniae*, presentanti $2n = 24$, tutte le specie esaminate hanno un numero diploide $2n = 22$.

Alcune osservazioni sono state fatte dal confronto tra lo stadio di prometafase e quello di metafase. È stato compiuto un piccolo passo avanti nel chiarimento della morfologia cromosomica, che rivela sempre una considerevole analogia in tutte le specie. Si possono distinguere 3 categorie rispetto alla mole cromosomica.

SOMATIC CHROMOSOMES OF *ASPIDISTRA* KER-GAWL

S. K. ROY

Department of Botany, University of Gorakhpur, Gorakhpur, (U.P.), India

Received: 1st October 1960*

Chromosomes of Liliaceae have always been considered as ideal materials for cytological studies. This is because of their long size and favourable response to majority of the fixing schedules. However, previous works were mainly centred around counts of chromosome numbers in this family especially because the chromosomes being excessively long, presented much difficulty in the interpretation of their morphology due to foreshortening of the arms. In recent years, the invention of the pre-treatment schedules have helped considerably in lessening this difficulty, thus allowing a detailed clarification of the karyotypes.

In spite of the fact the family is well explored from a cytological standpoint, a number of genera still remain uninvestigated. The genus *Aspidistra* Ker-Gawl found in the temperate regions of the Himalayas, is not cytologically well known. In one species, *A. elatior*, SATO (1942) reported $2n = 36$ chromosomes, whereas individuals of the same species as studied by HEITZ (1926) and GOLASZEWSKA (1934) revealed 32 chromosomes in the body cells. Nothing is known about the Indian species *A. lurida*.

The discrepant reports presented by different authors evidently call for a thorough investigation of the cytology of this genus. Instead of disqualifying the observations of either of the previous authors it may be stated that their data indicate the possibility of the existence of chromosomal biotypes in the species of this genus. With this consideration in view as well as taking into account the fact that members of this family have provided facts of fundamental importance, the present work on two varieties of *Aspidistra lurida* was undertaken.

MATERIALS AND METHODS

The materials for investigation comprised of the species *Aspidistra lurida* and a horticultural variety thereof, namely, *Aspidistra lurida* var. *variegata*. The plants were obtained from the Imperial Nursery, Calcutta, and maintained in earthenware pots in the University garden.

Studies on the somatic chromosomes were made from aceto-orcein squashes of

* The work was done in the Department of Botany, University of Calcutta, Calcutta.

fresh root tips. Different sets of root tips were pre-treated with saturated solutions of aesculin, paradichlorobenzene and 0.5% solution of colchicine. It was observed that the last mentioned chemical gave the best results as swelling was minimum and well scattered metaphase plates were obtained with constrictions clarified.

Usually the root tips were kept in 0.5% solution of colchicine for one hour under room temperature (90° F) followed by a thorough washing in running water for 20 minutes. Then these were fixed in acetic alcohol (1:2) for 45 minutes to one hour. Thicker roots were split longitudinally into two or more parts in order to facilitate penetration of the fixing fluid. After fixation the root tips were heated for a few seconds in a staining mixture made of 2% aceto-orcein solution and normal hydrochloric acid in the proportion of 9:1 and then squashed in 1% aceto-orcein solution.

OBSERVATIONS

« *Aspidistra lurida* » Ker-Gawl.

Somatic complement of the species normally contains 36 chromosomes. Variant metaphase plates with numbers ranging from 24 to 34 were commonly observed. Lesser and higher numbers than these two extremes occur rarely.

The size differences are quite marked amongst the chromosomes of the normal set, on the basis of which they can be divided into the following main types (Figs. 1, 1a).

1. A pair of long chromosomes.
2. Seven pairs of medium sized chromosomes.
3. Ten pairs of short chromosomes.

Type A - A pair of long chromosomes having two constrictions, primary and secondary, one nearly median in position and the other situated near the middle of one of the arms (8.75 μ approx.).

Type B - A pair of medium sized chromosomes having two constrictions, primary and secondary, one nearly median and the other sub-median in one of the arms (5.62 μ approx.).

Type C - One pair of medium sized chromosomes with nearly subterminal primary constrictions (5.62 μ approx.).

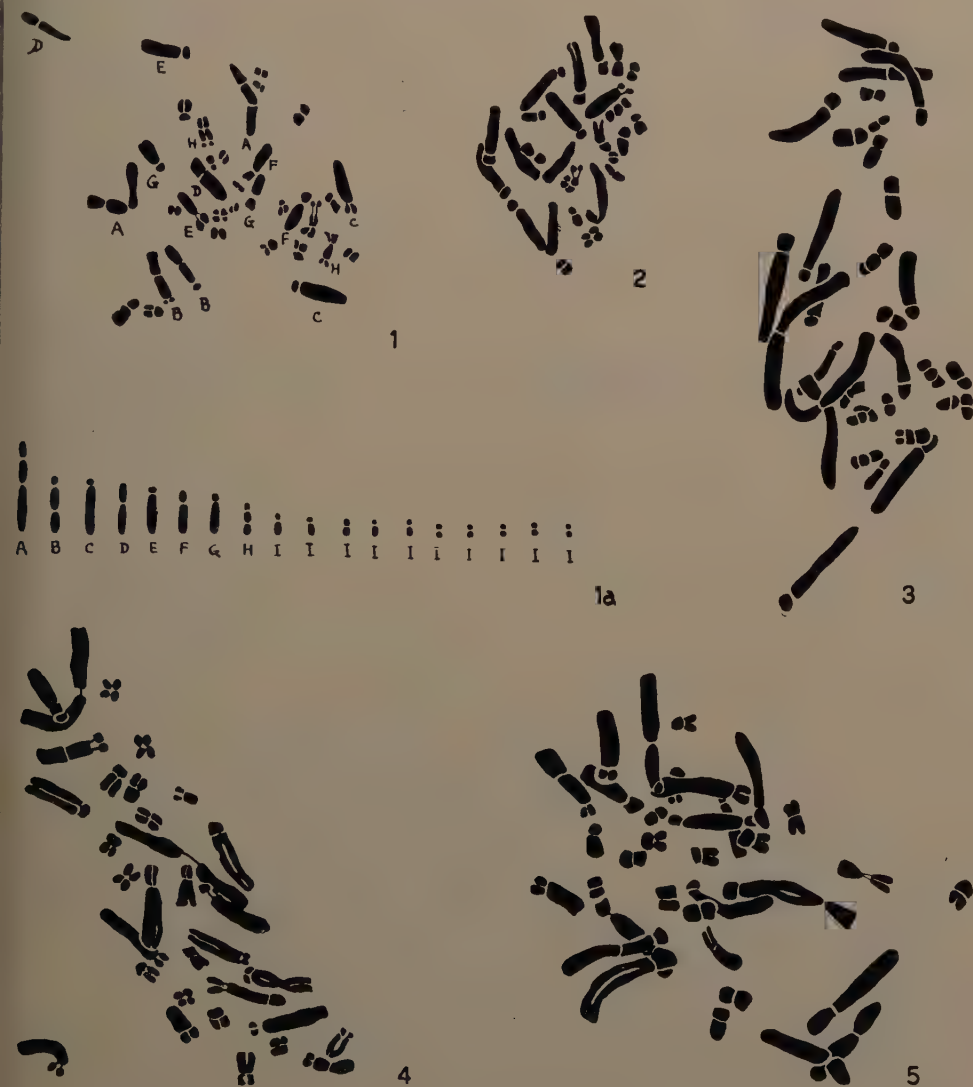
Type D - One pair of medium sized chromosomes with nearly median primary constrictions (5.0 μ approx.).

Type E - One pair of medium sized chromosomes with nearly subterminal primary constrictions but conspicuously smaller in size than the type C (4.90 μ approx.).

Type F - A pair of medium sized chromosomes with submedian primary constrictions (4.37 μ approx.).

Type H - Eleven pairs of short chromosomes slightly varying in size, each with one constriction ranging from submedian to median in position (2.18-1.25 μ approx.).

Hence the haploid set shows the presence of only three chromosomes with satellites or secondary constrictions. In addition to the normal types described above, cells with different chromosome numbers were met with in the same tissue (Figs. 2-5). In these the numbers round about 36 were more common than

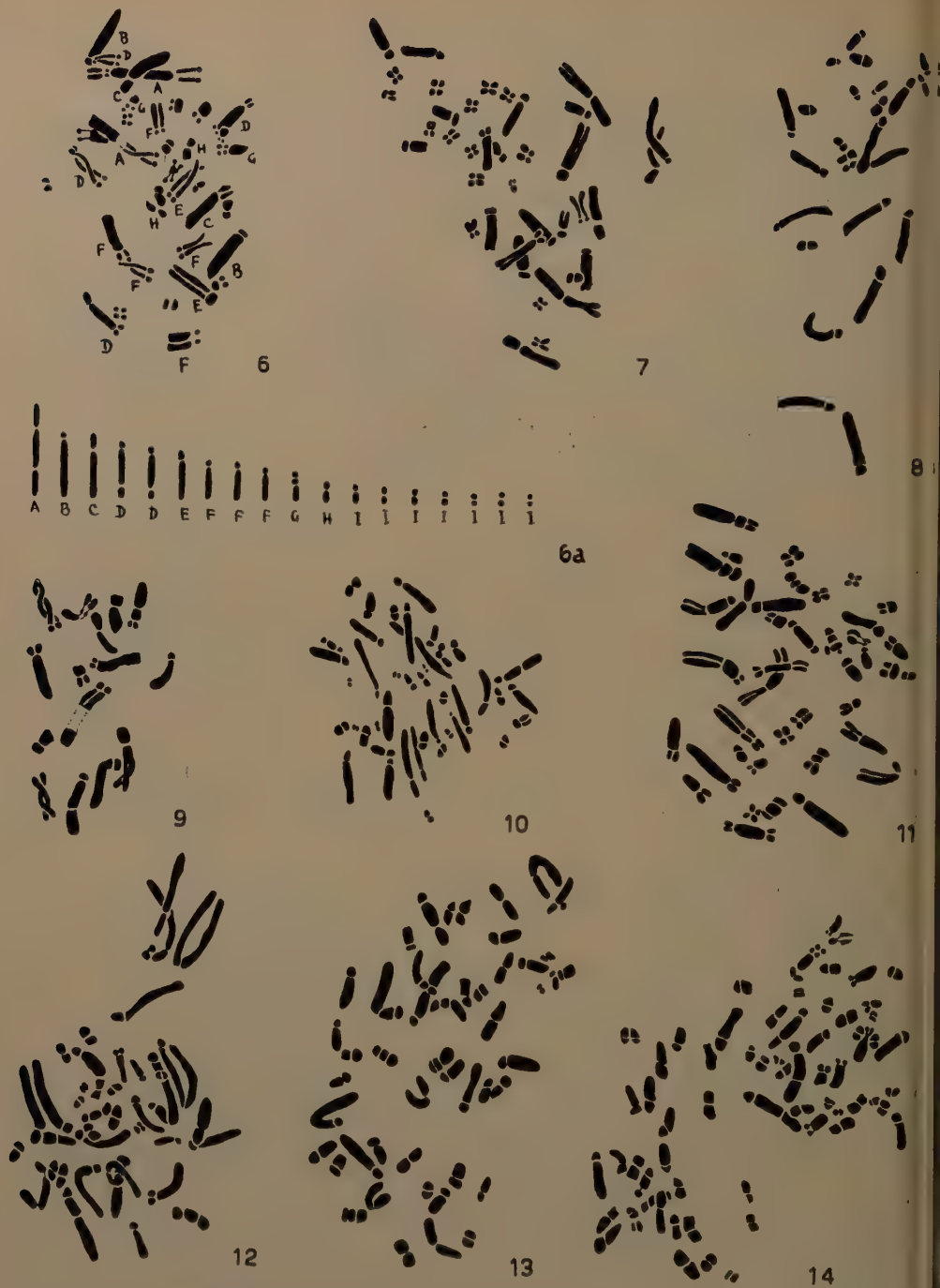


Figs. 1-5. — *Aspidistra lurida* Ker-Gawl.

Fig. 1. — Metaphase plate showing normal chromosome number.

Fig. 1a. — Idiogram of chromosomes shown in figure 1.

Figs. 2-5. — Variation plates showing 24, 33, 32 and 34 chromosomes respectively. All $\times 1600$.



Figs. 6-14. — *Aspidistra lurida* var. *variegata* Regel.
 Fig. 6. — Metaphase plate showing normal chromosome number.
 Fig. 6a. — Idiogram of chromosomes shown in figure 6.
 Figs. 7-14. — Variation metaphase plates showing 38, 24, 15, 44, 41, 42, 48 and 66 chromosomes respectively. All $\times 1600$.

very low or very high counts, such as those below twenty and above fifty. The numerically altered plates were in most cases accompanied by structural alterations as well. As no constancy in the structure of the chromosomes in variation nuclei was maintained, metaphase plates of the same were not analysed separately.

Aspidistra lurida » var. « *variegata* » Regel.

The normal number of chromosomes in the somatic metaphase is 36, but divergences from this number are so frequent that it becomes very difficult to determine it unless the chromosome count from numerous metaphase plates from



A. lurida var. variegata

A. lurida

Fig. 15. — Histogram showing chromatin matters in length of *A. lurida* var. *variegata* (upper) and *A. lurida* (lower).

large number of roots and individuals are done. Like the former, the size differences amongst the chromosomes are remarkable and on this basis they are divided into the following three main categories (Figs. 6, 6a).

1. A pair of long chromosomes.
2. Nine pairs of medium sized chromosomes.
3. Eight pairs of short chromosomes.

Type A - One pair of long chromosomes with two constrictions, primary and secondary, each being at the submedian position at two ends (9.84 μ approx.).

Type B - One pair of medium sized chromosomes with subterminal constrictions (6.87 μ approx.).

Type C - One pair of medium sized chromosomes with submedian constrictions (6.87 μ approx.).

Type D - Two pairs of medium sized chromosomes with two constrictions, one submedian and one subterminal in the two ends (6.00-5.31 μ approx.).

Type E - One pair of medium sized chromosomes with submedian constrictions. This pair is markedly different in size from the pair C (5.00 μ approx.).

Type F - Three pairs of medium sized chromosomes with subterminal constrictions.

Type G - One pair of medium sized chromosomes with two constrictions, one nearly median and the other median in one of the arms (3.12 μ approx.).

- Type H* - One pair of short chromosomes with a submedian constriction in each (2.2 μ approx.).
- Type I* - Seven pairs of short chromosomes differing in size with one constriction each, ranging from slightly submedian to median in position (1.87-1.25 μ approx.).

Hence the haploid set in this variety shows the presence of four satellited chromosomes.

Variation plates here were numerous (Figs. 7-14). Chromosome numbers like 30, 33, 34, 38, 40, 41 etc. were extremely common. Lower and higher numbers than these were also found. Numbers higher than sixty and lower than twenty were met with only on rare occasions.

DISCUSSION

An analysis of the karyotypes of two varieties of *Aspidistra lurida* reveals certain interesting differences. It may be noted that both of them are characterised by a normal complement of $2n = 36$ chromosomes. In spite of this similarity in chromosome number the karyotypes vary with respect to minor details. In general, however, there is a certain degree of similarity between the two in the sense that excepting the very long types A, the other members show a graded size difference in the complement. In general the chromosomes belong to the category of long, medium and short. The chromosome types also are identical to some extent but the karyotype formulae show distinct differences between the two. For example, the common type is provided with three pairs of chromosomes having secondary constrictions, whereas, there are four such pairs in the other variety. As regards the number of short chromosomes as well, the differences are clear. In the variety *variegata* the chromosome type D with two constrictions at two ends is not found in the other variety. These differences distinctly indicate the importance of structural alterations of chromosomes in the evolution of species and varieties. The study of the histogram (Fig. 6) no doubt represents slight difference in the chromatin matter between the two but this is quite expected in view of the fact that structural alterations often result in the elimination of chromatin matter.

As regards the origin of the two varieties, clues may be sought for in the chromosome behaviour noted in the somatic tissue. The figures reveal that in both the varieties considerable variations in the chromosome complement have been noted in the somatic tissue. Such variations are more in *variegata* than in the other variety. In the figures only the numerical alterations have been drawn leaving aside the structural alterations which are very frequent in number. Of

the variant nuclei the normal number had to be worked out by a study of the frequency, the one occurring in the highest frequency being taken as the normal.

The importance of such variations especially in species where sexual reproduction is almost obsolete as in *Aspidistra* is immense. This behaviour has been noted recently in a large number of species propagating through vegetative means where it has been shown that they play a distinct role in speciation (*vide*: SHARMA and SHARMA 1958). Such nuclei may enter into the formation of the daughter shoots and help in the origin of new individuals without undergoing the complicated means of sexual reproduction.

The inconstancy noted in the somatic chromosome complements coupled with the fact that the two varieties differ in structural details of chromosomes leads to the presumption that there is every possibility of one giving rise to the other form through vegetative means of reproduction. This becomes especially clear if one takes into consideration the nearly complete sexual sterility of the Indian forms.

It has been pointed out already that variations are more in the variety, *variegata* than in the other. This may indicate that the former is still maintaining a more unstable condition than the latter. This fact may be taken to imply its relative primitiveness.

The discussion and conclusion presented above have implications in the records of other *Aspidistra* species as made by previous authors. The present observations distinctly indicate the possibility of the existence of chromosomal biotypes differing from each other numerically as well. In view of this, it may be assumed that the individuals of *A. elatior* as studied by SATO (1942), as well as by HEITZ (1926) and GOLASZEWSKA (1934) may represent different chromosomal biotypes. A thorough search in this direction is necessary for all species of *Aspidistra*.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere thanks to Dr. A. K. SHARMA of the University of Calcutta for guidance and to Dr. S. M. SIRCAR for facilities.

REFERENCES

- GOLASZEWSKA Z., 1934. — *La formation du pollen et le garniture des chromosomes chez l'Aspidistra elatior*. Acta Soc. Bot. Poloniae, **2**: 85-102.
- HEITZ E., 1926. — *Der Nachweis der Chromosomen. Vergleichende Studien über ihre Zahl, Grösse und Form im Pflanzenreich*. I. Zeits. f. Bot., **18**: 625-681.
- SATO D., 1942. — *Karyotype alteration and phylogeny*. V. New types of SAT-chromosome in *Nothoscordum* and *Nerine*. Cytologia, **12**: 170-178.
- SHARMA A. K. and SHARMA A., 1959. — *Recent advances in the study of chromosomal alterations with relation to speciation*. Bot. Rev., **25**: 514-544.

SUMMARY

Two varieties of *Aspidistra*, viz., *A. lurida* and *A. lurida* var. *variegata* were worked out cytologically and both showed $2n = 36$ chromosomes. In the normal set *A. lurida* showed one pair of long, seven pairs of medium sized and ten pairs of short chromosomes. Of these there were only three pairs of chromosomes with satellites. In *A. lurida* var. *variegata*, however, there were one pair of long, nine pairs of medium sized and eight pairs of short chromosomes. Four chromosomes were with secondary constriction. The histograms of the two varieties showed a clear difference accounting for their varietal status.

In addition to the normal number numerically altered plates accompanied by an alteration of the structure of the chromosomes to various degrees were of frequent occurrence in the variety, *variegata*. Such plates were also observed in some preparations of the other variety. The chromosome number of the variant nuclei ranged from 15 to 66. The frequent occurrence of such cells indicated the primitive and unstable nature of *A. lurida* var. *variegata* and also lends support to the view of speciation by vegetative means.

RIASSUNTO

Sono state studiate dal punto di vista citologico due varietà del genere *Aspidistra*, *A. lurida* e *A. lurida* var. *variegata*, le quali si son dimostrate esser caratterizzate da $2n = 36$. Il cariotipo normale di *A. lurida* si presenta costituito da un paio di cromosomi lunghi, da sette paia di media grandezza e da dieci paia di piccola grandezza. Di questi solo tre paia sono satellitati. In *A. lurida* var. *variegata*, invece, ci sono un paio di cromosomi lunghi, nove paia di media grandezza e otto paia di piccola grandezza. Quattro cromosomi presentano una costrizione secondaria. Gli istogrammi dei due esemplari mostrano una chiara differenza, sufficiente a dimostrare il loro stato di varietà.

Nella varietà *variegata*, in aggiunta alle piastre con numero normale di cromosomi, di frequente ne sono state riscontrate alcune anomale numericamente e con una alterazione in vario grado della struttura dei cromosomi. Tali piastre sono state osservate anche in preparati di altre varietà. Il numero cromosomico di tali nuclei alterati variava tra 15 e 66. La frequenza di tali cellule indica la natura primitiva e instabile di *A. lurida* var. *variegata* e sostiene anche il punto di vista della speciazione attraverso mezzi vegetativi.

RICERCHE EMBRIOLOGICHE SU *RUDBECKIA MISSOURIENSIS* ENGELM. (COMPOSITAE)

GIULIANO CESCO

Istituto di Botanica dell'Università, Pisa

In Redazione: il 1° Novembre 1960*

Rudbeckia missouriensis Engelm. appartiene alla sezione *Eurudbeckia* del genere *Rudbeckia* (Compositae) diffuso nell'America del Nord e nel Messico con trenta specie circa. Vive nei luoghi asciutti ed aperti dal Montana al Texas.

A garanzia di omogeneità genetica, l'indagine è stata condotta su un solo esemplare, tuttora coltivato in vaso nell'Orto Botanico di Pisa, nato da seme raccolto da R. A. Evers il 21 Ottobre 1955 e cortesemente inviato al Prof. E. Battaglia con le seguenti precisazioni: « *In Sampson hill prairie, north of Prairie du Rocher, Randolph County, Illinois, U.S.A.* ».

Descrizione dell'esemplare studiato (Fig. 1). — *Fusto* alto 35-50 cm, largo 4 mm circa, densamente irsuto, con rami fiorali ben sviluppati nella parte superiore ed in numero di 7-8, portanti un singolo capolino oppure, ma raramente, due di cui allora uno arretrato nello sviluppo. Dalla sua base si dipartono numerosi brevi stoloni densamente fogliosi. *Foglie basali* presenti all'inizio, prima che lo stolone allungandosi dia origine al fusto fiorifero; secche o perdute all'antesi; lineari-oblunghe od ovato-lanceolate, lungamente picciolate con picciuolo strettamente alato nella parte superiore, irsute, 3-5nervie, con denticoli appena accennati e fortemente distanziati ai margini; apice acuto o, per lo più, ottuso-rotondato; lunghezza cm 5-15; larghezza mm 15-23. *Foglie non basali* lineari spatolate, intere o, le maggiori, denticolate; brevissimamente picciolate o per lo più sessili; 3-nervie o talvolta 5-nervie; irsute; le maggiori lunghe 9 cm al massimo e larghe fino ad 8-10 mm; più numerose quelle minori lunghe 4-5 cm e larghe 5-8 mm. *Capolini* più o meno lungamente pedunculati di diametro fino a 6-7 cm a raggi distesi. *Brattee involucri* su due serie, le esterne più lunghe in numero di 7-8, le più interne più corte di $\frac{1}{3}$ circa in numero più o meno uguale, diffusamente irsute, ciliolate ai margini, all'inizio patenti, riflesse nel capolino adulto. *Fiori del raggio* da 7 a 13, ma per lo più 8. *Ligule* all'inizio patenti, poi riflesse, lunghe fino a 3,5 cm, larghe 5-10 mm, uniformemente gialle, glabre superiormente, al di sotto provviste verso l'apice di rade ciglia visibili a forte ingrandimento; estremità libera intera o appena incisa. *Disco* conico a maturità, di diametro fino a 17 mm e di altezza fino a 15-18 mm; dopo l'antesi bruno o purpureo scuro, prima verdastro. *Achenio e pappo* (Fig. 3): achenio

* Lavoro pubblicato con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.



Fig. 1. — *Rudbeckia missouriensis* Engelm.: l'esemplare oggetto della presente ricerca.

bruno scuro, provvisto intorno al margine superiore di una coroncina scariosa ondulata (residuo del pappo) e ricoperto all'esterno dalla palea. *Palee* (Fig. 2) lunghe mm 5 circa e larghe mm 2 circa, giallastre, con margine scarioso, ondulato verso l'alto, percorse longitudinalmente da tre striscie rosso marrone o brune; apice appuntito.

La fioritura avviene da luglio a settembre.



Fig. 2. — Palea.

1 mm.



Fig. 3. — Achenio.

Il materiale studiato è stato fissato in liquido di Karpetschenko e colorato con ematossilina Heidenhain. È stata sperimentata con ottimi risultati la chiusura dei preparati con « Euparal » invece che con l'usuale balsamo del Canada.

L'unica cellula archisporiale in *Rudbeckia missouriensis* Engelm. si trasforma direttamente in cellula madre delle megaspore (Fig. 4). Questa presenta contorno più o meno arrotondato, citoplasma denso e un grande nucleo generalmente caratterizzato da due nucleoli ben evidenti.



Fig. 4. — Cellula madre delle megaspore.

Fig. 5. — Cellula madre delle megaspore in sinapsi.

Fig. 6. — Cellula madre delle megaspore in diacinesi.

Fig. 7. — Metafase della divisione eterotipica.

Fig. 8. — Apocizio binucleato ottenuto dalla divisione eterotipica.

Fig. 9. — Metafase della seconda divisione meiotica.

Fig. 10. — Telofase della seconda divisione meiotica.

Fig. 11. — Apocizio tetranucleato ottenuto dalla seconda divisione meiotica.

Figg. 12 e 13. — Stadio tetranucleato primario: si osservi la formazione secondaria di fibrille fusali.

Le figure sono state disegnate con l'ingrandimento $\times 1100$ ca. e riprodotte con riduzione di $1/3$.

Lo stadio di sinapsi, a giudicare dalla frequenza con cui lo si ritrova nei preparati, è di assai lunga durata e mostra quasi sempre un solo nucleolo. La fig. 5 testimonia che questo rimane sempre estraneo al groviglio sinaptico, il

quale per la sua maggiore densità tende a poggiare sulla membrana nucleare rivolta verso il micropilo, cioè in basso, essendo l'ovulo anatropo.

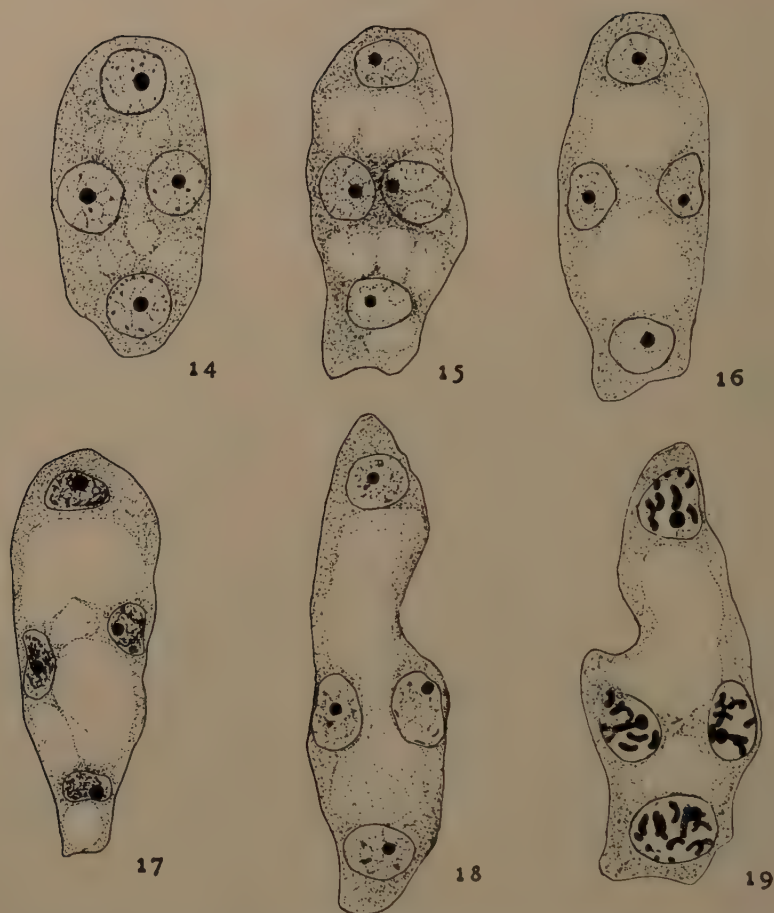
Le figg. 6 e 7 documentano gli stadi di diacinesi e di metafase eterotipica. Il fuso, orientato secondo l'asse maggiore della cellula, si forma sempre entro i limiti ancora apprezzabili della cavità nucleare, quest'ultima chiaramente delimitata da un addensamento citoplasmatico lungamente persistente. Il fenomeno si ripete alla successiva divisione (II divisione meiotica od omeotipica; Figg. 9 e 10).

Tanto la prima che la seconda divisione non sono seguite da alcuna formazione di membrana, per cui ne risulta rispettivamente un apocizio binucleato (Fig. 8) ed un apocizio tetranucleato (Fig. 11), i nuclei del quale hanno significato di nuclei megasporiali. Quest'ultimo stadio è denominato « stadio tetranucleato primario » per distinguerlo da un successivo « stadio tetranucleato secondario », come fra poco diremo.

In relazione all'orientamento dei fusi omeotipici, i quattro nuclei, tutti delle stesse dimensioni, sono disposti a due a due o (Fig. 12) secondo due assi più o meno paralleli tra loro ed obliqui rispetto all'asse dell'apocizio, oppure (Fig. 13) due secondo l'asse maggiore e due obliquamente. Questi nuclei non appaiono mai disposti uno sopra l'altro a pila od a croce (con i nuclei mediani più piccoli e strettamente accollati) come si osserva in altre specie (ad es. in *Euphorbia dulcis* L., cfr. CARANO 1926) dove, causa la ristrettezza dell'apocizio, i fusi non possono orientarsi liberamente, ma solo secondo l'asse maggiore. Tra i nuclei vicini di ciascuna coppia si ha a questo punto, come mostrano le figure citate, una caratteristica formazione secondaria di fibrille fusali.

Mentre nel corso della meiosi l'accrescimento citoplasmatico è stato piuttosto modesto, adesso il gametofito tetranucleato primario aumenta in breve tempo le sue dimensioni, ed in particolar modo subisce un forte allungamento della regione micropilare, che viene infine a trovarsi notevolmente distanziata dalla regione calazale. Tale accrescimento è concomitante ad una vacuolizzazione, prima minuta e diffusa, poi intensa e localizzata, in seguito alla quale vengono a formarsi due vacuoli, uno più ampio micropilare ed uno più piccolo calazale, che poi confluiscono in uno solo. Spesso si osserva pure un piccolo vacuolo localizzato al di sotto del nucleo più calazale: tale vacuolo persiste fino all'ultima divisione del gametofito. (Figg. 14, 15, 16, 17, 18).

Conseguenza della vacuolizzazione e dell'allungamento è il fenomeno della polarizzazione dei nuclei, che segue lo schema 1+3 caratteristico del « tipo *Euphorbia dulcis* » (CHIARUGI 1927; MARTINOLI 1940) o tipo *Fritillaria* degli autori stranieri. La fig. 19 mostra appunto un tetranucleato primario perfettamente vacuolizzato e polarizzato, con i quattro nuclei in avanzata profase. Nella tappa successiva (Fig. 20) il gametofito presenta al micropilo una normale piastra metafisica aploide ed alla calaza una piastra metafisica triploide. Il risultato



Figg. 14, 15, 16, 17 e 18. — Diverse fasi dell'accrescimento, della vacuolizzazione e della polarizzazione dei nuclei dello stadio tetranucleato primario.

Fig. 19. — Apocizio tetranucleato primario con polarizzazione 1+3 e nuclei in avanzata profase.

di questa divisione è lo « stadio tetranucleato secondario » caratterizzato da due nuclei aploidi al micropilo e da due nuclei triploidi calazali, più grandi e provvi-

Fig. 20. — Metafase della terza divisione con piastra triploide alla calaza.

Fig. 21. — Stadio tetranucleato secondario.

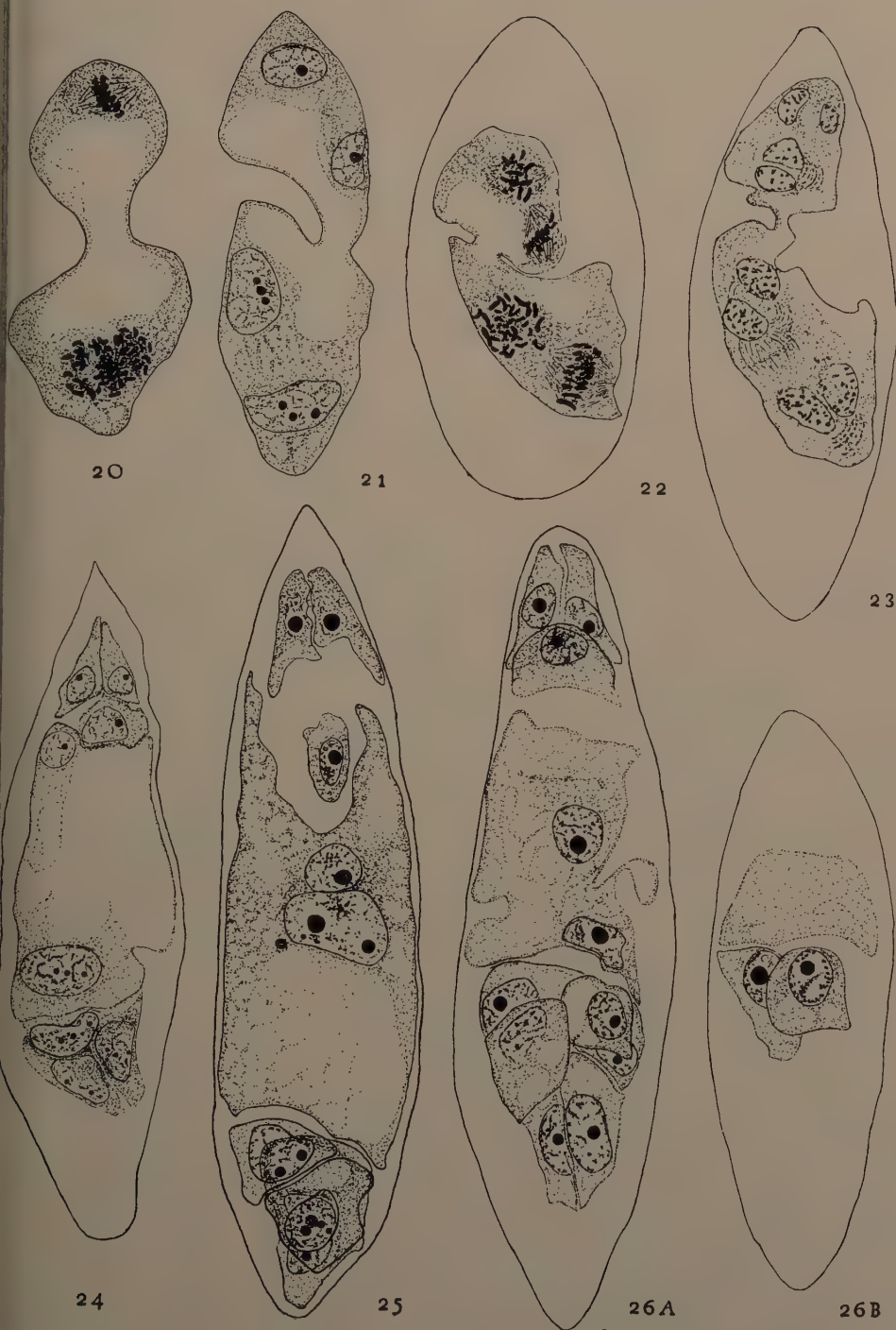
Fig. 22. — Metafase dell'ultima divisione dello sviluppo.

Fig. 23. — Stadio 8-nucleato.

Fig. 24. — Processo di cellularizzazione dello stadio 8-nucleato.

Fig. 25. — Gametofito adulto 8-nucleato.

Figg. 26A e 26B. — Gametofito adulto di « tipo *Pyrethrum cinerariaefolium* 12-nucleato ». Le figure sono state disegnate con l'ingrandimento $\times 1100$ ca. e riprodotte con riduzione di $1/3$.



sti generalmente di tre nucleoli (Fig. 21). Questo stadio, oltre che per le diverse dimensioni dei nuclei, si distingue a prima vista dal tetranucleato primario per la presenza del grande vacuolo centrale.

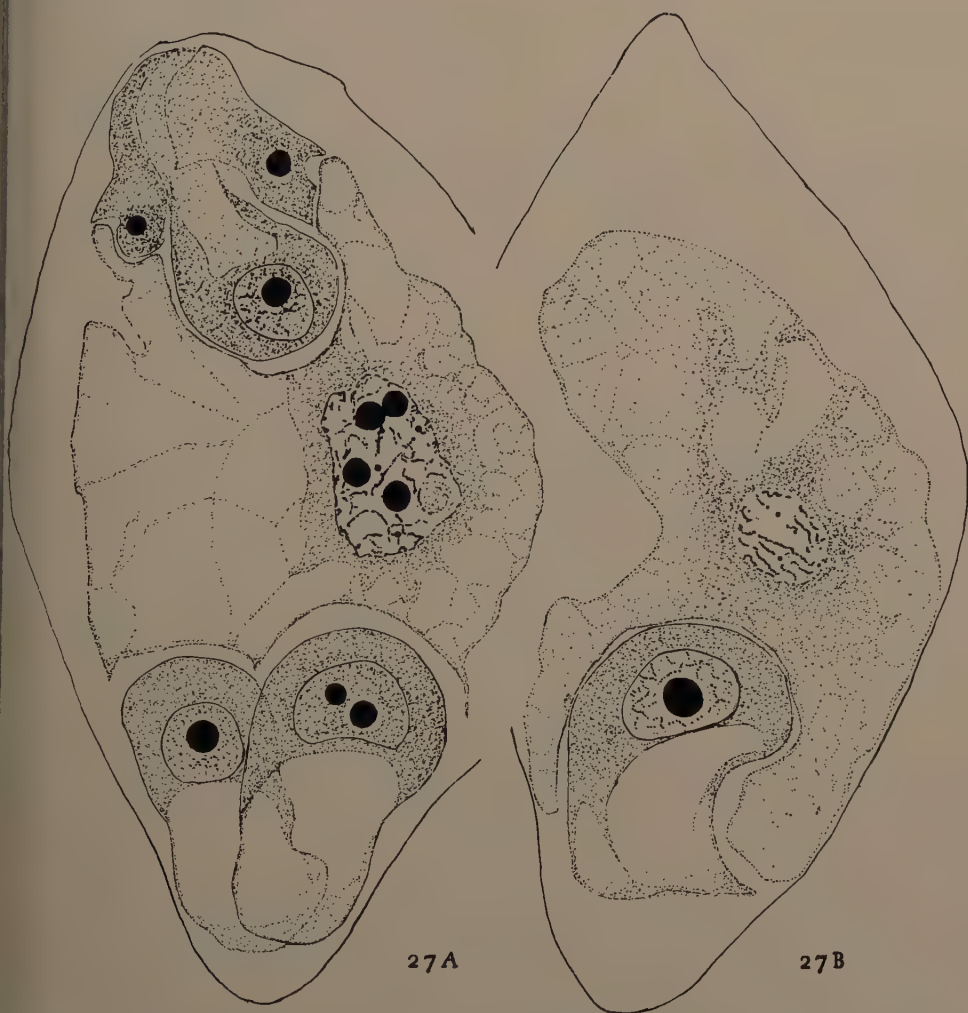
Con un'ulteriore divisione (Fig. 22), in cui è evidente per le dimensioni stesse dei fusi (e relativi ammassi cromosomici), la poliploidia della regione calazale si raggiunge lo stadio 8-nucleato (Fig. 23).

La cellularizzazione avviene in due momenti successivi; in un primo tempo si separano secondo piani orizzontali due porzioni citoplasmatiche, una micropilare ed una calazale, contenenti due nuclei ciascuna, poi questi si cellularizzano, per lo stabilirsi di pareti verticali, dando due sinergidi e rispettivamente due antipodi e nello stesso tempo la cellula uovo e la terza antipode si separano dalla cellula proendospermatrica in cui restano compresi i due nuclei polari, il micropilare aploide ed il calazale triploide (Figg. 24 e 25).

A questo punto il gametofito 8-nucleato ormai adulto subisce una seconda fase di intenso accrescimento, questa volta più sensibile nel senso della larghezza, ed effettua la fusione dei nuclei polari realizzando l'unico nucleo secondario ovviamente tetraploide. In queste condizioni il gametofito è finalmente maturo per la fecondazione. Le sinergidi, in genere di forma grossolanamente triangolare ed affiancate, partecipano, sia pure in minor grado, al generale accrescimento del gametofito. Esse non assumono però mai contorni perfettamente regolari e ben definiti e conservano citoplasma addensato intorno al nucleo piccolo e rotondeggiante di cui in genere non è visibile che il grosso nucleolo circondato da un alone più chiaro. L'oosfera è sempre piriforme con un ampio vacuolo basale e grande nucleo con un solo nucleolo. Da una parte si inserisce tra le due sinergidi, dall'altra sporge entro la cellula proendospermatrica. Delle tre antipodi almeno una è oosimile, cioè ipertrofica e conformata ad immagine speculare della legittima oosfera, donde ne risulta una perfetta simmetria tra i due apparati antipodale ed ovarico. Spesso tuttavia si dà il caso che tutte e tre le antipodi vengano a trovarsi nelle stesse identiche condizioni di differenziamento per cui danno origine a ben tre antipodi oosimili (Figg. 27 A, 27 B). Le antipodi non oosimili hanno aspetto molto variabile; possono essere simili alle sinergidi, ma allora hanno nucleo rotondo od allungato ben evidente (con uno o più nucleoli), oppure sviluppano un vacuolo apicale per cui il nucleo, ampio e rotondo, rimane confinato nella parte basale. In un caso ho osservato due vacuoli, uno apicale ed uno basale, separati da un istmo citoplasmatico contenente il nucleo. Nei miei preparati, lo stadio di gametofito maturo possiede nel 37% dei casi tre antipodi oosimili, nel 17% due antipodi oosimili e nel 46% una sola antipode oosimile.

Quanto finora descritto costituisce l'usuale comportamento embriologico della specie studiata. Eccezionalmente abbiamo tuttavia osservato anche un interessante caso anomalo (Figg. 26 A e 26 B). Si tratta di un gametofito adulto,

che va senz'altro inquadrato in un tipo di sviluppo diverso e più precisamente nel « tipo *Pyrethrum cinerariaefolium* » (MARTINOLI 1939), sottotipo 12-nucleato. Tale gametofito presenta un apparato ovarico normale, una cellula proendo-



Figg. 27A e 27B. — Gametofito maturo con tre antipodi oosimili. Le figure sono state disegnate con l'ingrandimento $\times 1100$ ca. e riprodotte con riduzione di $1/3$.

spermatICA binucleata e sette antipodi. Un siffatto numero di antipodi, data la posizione reciproca delle cellule, le loro dimensioni e l'età del gametofito, non può essersi prodotto per moltiplicazione delle antipodi (fenomeno della poliantipodia), ma bensì come conseguenza ultima di una polarizzazione del tipo $1+2+1$

oppure 1+1+2 cui seguì per coalescenza fusale a due (anzichè a tre) nella mitosi successiva, uno stadio 6-nucleato equivalente al tetranucleato secondario del caso più frequente. Con un'ulteriore divisione dello stadio 6-nucleato si passò a quello finale 12-nucleato, proprio del « tipo *Pyrethrum cinerariaefolium* », tipo comunque già in precedenza osservato in *Rudbeckia columnaris* Sims (Fig. 33, BATTAGLIA 1952a). Quest'ultima coesistenza nella stessa specie del « tipo *Pyrethrum cinerariaefolium* » o del « tipo *Pyrethrum parthenifolium* » accanto al « tipo *Euphorbia dulcis* » è rara nella letteratura (vedi ad esempio: *Tamarix gallica* L. e *T. africana* Poir., BATTAGLIA 1951; ecc.) ed è stata da me riscontrata anche nella stessa *Euphorbia dulcis* L. (CESCA, *inedito*).

In *Rudbeckia missouriensis* Engelm. si ha infine regolare anfigmisi: il tubetto pollinico penetra nel gametofito dal micropilo distruggendo una sinergide e liberando nel modo consueto i due nuclei spermatici.

L'embrione si sviluppa secondo il noto tipo delle Asteracee e l'endosperma è di tipo cellulare. Le cellule endospermatiche presentano grossi nuclei con numerosi nucleoli. Dopo la fecondazione i resti delle sinergidi rapidamente scompaiono; non si può invece dire altrettanto dell'apparato antipodale. Delle tre antipodi almeno una, l'oosimile, permane a lungo e si osserva ancora intatta in stadi molto avanzati dell'embrione.

La microsporogenesi si svolge in modo del tutto regolare e la separazione delle microspore è di tipo simultaneo. Il tappeto è di tipo ameboide con formazione di periplasmodio.

Le osservazioni compiute su cellule in diacinesi tanto nella macro- che nella micro-sporogenesi indicano un numero cromosomico aploide aggirantesi su $n = 18-19$.

Ringrazio vivamente il Chiar.mo Prof. GIUSEPPE MARTINOLI, sotto la cui direzione fu eseguita l'intera ricerca, ed il Chiar.mo Prof. EMILIO BATTAGLIA per i consigli datimi nell'esecuzione del lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- BAMBACIONI V., 1928. — *Ricerche sulla ecologia e sulla embriologia di Fritillaria persica* L. Ann. di Bot., **18**: 7-37.
- BATTAGLIA E., 1941. — *Contributo all'embriologia delle Tamaricaceae*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **48**: 575-612.
- , 1946. — *Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere Rudbeckia (Asteraceae)*. I-V Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **53**: 1-26.
- , 1952a. — *Ricerche embriologiche su Rudbeckia columnaris* Sims. Atti Soc. Toscana Sc. Nat., Serie B, **59**: 172-197.
- , 1952b. — *Nuovi reperti di apomissia e di amfigmisi nel genere Rudbeckia (Compositae)*. Atti Soc. Toscana Sc. Nat., Serie B, **59**: 205-209.
- CARANO E., 1926. — *Ulteriori osservazioni su Euphorbia dulcis* L., in rapporto col suo comportamento apomittico. Ann. di Bot., **17**: 70-79.
- CHIARUGI A., 1950. — *La poliploidia della generazione aploide femminile delle Fanerogame*. Caryologia, **3**: 149-155.

- ABHESHWARI P., 1950. — *An introduction to the embryology of Angiosperms*. Mc Graw-Hill Book Company Inc., New York.
- ARTINOLI G., 1939. — *Contributo all'embriologia delle Asteraceae. I-III*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **46**: 259-298.
- , 1940. — *La priorità della denominazione « tipo Euphorbia dulcis » (1927) sulla denominazione « tipo Fritillaria » (1937)*. Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., **47**: 464-468.

SUMMARY

The embryo-sac development of *Rudbeckia missouriensis* Engelm. follows the « *Euphorbia dulcis* type » (« = *Fritillaria type* ») and rarely the « *Pyrethrum cinerariaefolium* 12-nucleate type ». The mature embryo-sac is sometimes characterized by the occurrence of two or three egg-like antipodals.

Regular fertilization takes place and the embryo arises according to the Asterad type of development.

At the diakinesis stage 18-19 bivalents have been observed.

RIASSUNTO

Il gametofito femminile di *Rudbeckia missouriensis* Engelm. si sviluppa secondo il tipo *Euphorbia dulcis*. Le particolarità più notevoli sono la comparsa occasionale del tipo di sviluppo *Pyrethrum cinerariaefolium* e la frequente presenza (nei gametofiti maturi) di due o tre antipodi oosimili, anziché una sola come di regola.

La microporogenesi è regolare.

Si ha normale anfigmisi e l'embrione che ne deriva si sviluppa secondo il tipo delle Asteracee.

Da osservazioni nella micro- e nella mega-sporogenesi il numero cromosomico aploide si aggira intorno a $n = 18-19$.

CYTOLOGICAL STUDIES ON THE GENUS *RUSSELIA*

N. PAL

Department of Biology, Maulana Azad Coll., Calcutta-13, India

Received: 1st September 1960

The chromosome numbers of many genera and species of the family Scrofulariaceae have already been reported and it appears (DARLINGTON and WYLIE 1955) that these are very variable in different genera. Detailed cytological counts in members of this family, however, seem to be scarce. SRINATH (1939, 1940a, 1940b) in a series of publications has described the karyotypes and the meiotic behaviour of chromosomes in a number of species of the genus *alceolaria*.

RAGHAVAN and SRINIVASAN (1940) have determined the chromosome number = 10 in *Russelia juncea* Zucc. and *R. rotundifolia* Cav. The present materials *Russelia equisetiformis* Schlecht et Cham. (*R. juncea* Zucc.) and *R. coccinea* (Linn.) Wettst. (*R. sarmentosa* Jack in part.) are Mexican plants (BOR and RAIZADA 1946; RAIZADA 1958) which are introduced in this country and now-a-days cultivated everywhere in India. It is interesting to note that these plants growing in India does not set fruits and propagation is made only by vegetative methods. The present investigation was undertaken primarily with the hope that a detailed cytological study might indicate the cause of sterility in these species.

MATERIALS AND METHODS

The materials of *R. equisetiformis* were collected from the Ballygunge Science College campus of Calcutta University and those of *R. coccinea* from the Indian Botanical Garden, Sibpur, Howrah. For the purpose of studying somatic chromosomes, the young branches of these plants were allowed to root by layering or by keeping the cut young twigs covered by a bell-jar in moist condition when roots appeared from the nodal regions near the growing apices of the stem.

The observations on the morphology of somatic chromosomes were made from root-tip squash preparations. Healthy root tips were subjected to treatment in saturated aqueous solution of aesculin (which produced best results amongst pretreatment chemicals tried) at 15° C for about 20 minutes (SHARMA and SIRCAR 1955) between 10 A.M. to 12 A.M. noon, fixed in 1 : 2 acetic-alcohol in room-temperature for 1 hour and then hydrolysed and stained in a mixture of 2% aceto-orcein and N/HCl (9:1) followed by the preparation of squash of root-tip meristem in 1% aceto-orcein.

Young flower buds were fixed in various fixatives for observations on meiotic

chromosomes, of which Karpechenko's fluid proved most satisfactory. The buds were pretreated with Carnoy's fluid (6:3:1) for about 5-10 seconds to remove the wax coating and washed thoroughly in water before fixation. Fixation was made at different hours between 9 A.M. and 12 A.M. noon. Dehydration, clearing and infiltration were done in the customary way and paraffin sections were cut at 11-14 μ thickness. Newton's crystal-violet-iodine method was used in staining. Some sections were also stained after Feulgen's technique.

OBSERVATIONS

« *Russelia equisetiformis* » Schlecht et Cham.

Somatic chromosomes. — The somatic chromosome number in this species has been found to be 20 (Fig. 1a). Size difference of the chromosomes is not very conspicuous. On the basis of the relative length, they can be grouped under two categories: Five pairs of long chromosomes (3.2-4.2 μ) of which two pairs are satellited, and five pairs of medium-sized chromosomes (2.4-3.0 μ). Six chromosomes are with nearly median, ten with submedian and four with subterminal centromeres. An idiogrammatic representation of the chromosomes reveals the following types (Fig. 1b).

- Type A* - One pair of long chromosomes (4.2 μ) with submedian centromere and with microsatellite on the distal end of the long arm.
- Type B* - A pair of long chromosomes (3.8 μ) with nearly median centromere.
- Type C* - One pair of long chromosomes (3.6 μ) with nearly median centromere and with microsatellite on the distal end of the shorter arm.
- Type D* - One pair of long chromosomes (3.2 μ) with submedian centromere.
- Type E* - A pair of long chromosomes (3.2 μ) with nearly median centromere.
- Type F* - One pair of medium-sized chromosomes (3.0 μ) with subterminal centromere.
- Types G and H* - There pairs of medium-sized chromosomes (2.7-2.7-2.6 μ) with submedian centromeres.
- Type I* - One pair of medium-sized chromosomes (2.4 μ) with subterminal centromere.

Meiotic chromosomes. — Ten bivalents show different configurations at diakinesis due to different degrees of terminalization of chiasma (Fig. 2). They do not vary much in size. The presence of ten bivalents has also been noted in polar view of first division metaphase (Figs. 3-9). The presence of secondary association between the bivalents has been recorded. The least number of groupings as will be evident from figures 3-9 and Table I, seems to be four [2(3) + 2(2)] only.

In side view of metaphase I, all the bivalents are not typically aligned at the equatorial region of the spindle. Disjunction of bivalents at anaphase I is fairly normal though in a number of pollen-mother cells early separation has been



Figs. 1-16. — *Russelia equisetiformis*.

Fig. 1a. — Somatic metaphase plate showing 20 chromosomes; $\times 3500$.

Fig. 1b. — Idiogram of the same.

Fig. 2. — Diakinesis showing 10 clear bivalents; $\times 3500$.

Figs. 3-9. — Metaphase I (polar view) showing types of secondary association of bivalents; $\times 3500$.

Fig. 10. — Late metaphase I (side view) showing early separation of some chromosomes; $\times 3500$.

Figs. 11 and 12. — Anaphase I showing the unequal and normal separation of the bivalents; $\times 3500$.

Fig. 13. — Interkinetic nuclei in the pollen-mother cell; $\times 3500$.

Figs. 14 and 15. — Early separation of the chromosomes during homotypic division; $\times 3500$.

Fig. 16. — Pollen-mother cell at late anaphase II showing the presence of extranuclear bodies in cytoplasm; $\times 3500$.

TABLE I

Types of secondary association in « Russelia equisetiformis »

| No. | Different configurations | Frequency of occurrence in 100 mother cells | Maximum association | Units of groupings |
|-----|-------------------------------|---|---------------------|--------------------|
| 1. | 1 (4) + 3 (2) | 3 | | 4 |
| 2. | 1 (4) + 1 (3) + 1 (2) + 1 (1) | 6 | | " |
| 3. | 3 (3) + 1 (1) | 3 | | " |
| 4. | 2 (3) + 2 (2) | 4 | 2 (3) + 2 (2) | " |
| 5. | 1 (3) + 3 (2) + 1 (1) | 5 | | 5 |
| 6. | 2 (3) + 1 (2) + 2 (1) | 4 | | " |
| 7. | 1 (4) + 1 (3) + 3 (1) | 3 | | " |
| 8. | 4 (2) + 2 (1) | 8 | | 6 |
| 9. | 1 (3) + 2 (2) + 3 (1) | 24 | | " |
| 10. | 2 (3) + 4 (1) | 11 | | " |
| 11. | 1 (4) + 1 (2) + 4 (1) | 6 | | " |
| 12. | 3 (2) + 4 (1) | 8 | | 7 |
| 13. | 1 (3) + 1 (2) + 5 (1) | 6 | | " |
| 14. | 1 (3) + 7 (1) | 4 | | 8 |
| 15. | 2 (2) + 6 (1) | 3 | | " |
| 16. | 1 (2) + 8 (1) | 2 | | 9 |

encountered. In these cases, generally only one chromosome of a bivalent moves early towards a pole, while the other is retained at the equatorial region for some time (Fig. 10). In a few instances, eleven chromosomes have been observed proceeding towards one pole and the remaining nine towards the other (Fig. 11). This is possibly due to non-disjunction of bivalent at the proper time.

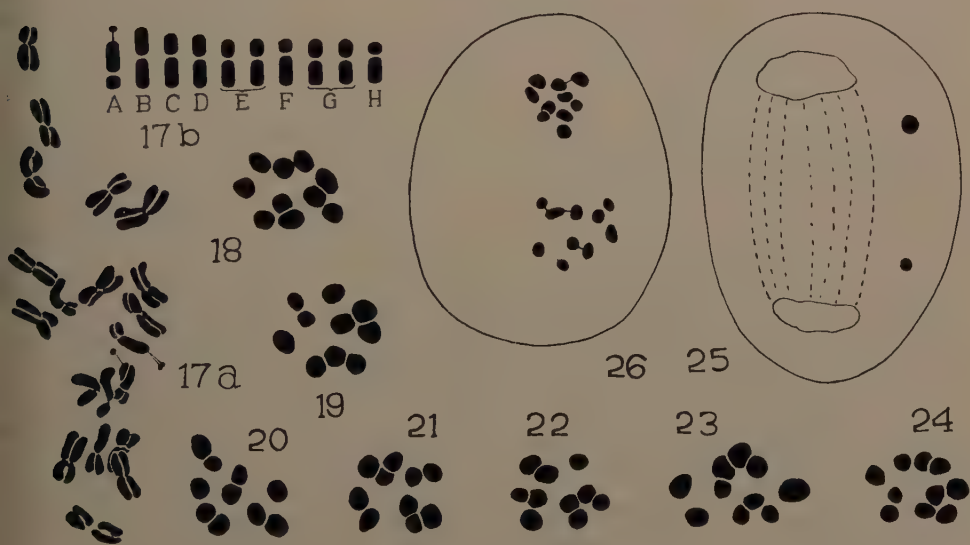
In the interkinetic nucleus, as also in the polar view of metaphase II, the presence of ten chromosomes is clear (Fig. 13). These also show grouping. The complete separation and consequent movement of some of the chromosomes at anaphase II may also take place precociously (Fig. 15). In these cases also the movement of the daughter chromosomes may not be simultaneous (Fig. 14). In general, however, meiosis is normal.

The presence of some extranuclear bodies in the cytoplasm of pollen-mother cells which are apparently similar to the meiotic chromosomes has been recorded. These extranuclear bodies are deeply stained with crystal violet but are Feulgen-negative. These are more abundant at the later stages of meiosis (Fig. 16) and specially in the infected flower buds as also in the unhealthy stamens. It may be mentioned here that the plants are occasionally subjected to an attack by some insects and many flower buds are bored through which otherwise appear healthy and normal.

There is lack of synchronisation in the meiotic stages. Thus it has been found that while one loculus of an anther contains pollen-mother cells at metaphase I, the other loculus of the same have pollen tetrads or the immature mother-cells with no sign of rounding up. Even the upper and lower ends of the same loculus contain pollen-mother cells at distinctly different stages of maturation.

« *Russelia coccinea* » (Linn.) Wettst.

Karyotype analysis. — This species also shows the presence of 20 chromosomes in the somatic set but they are comparatively much smaller in size (Fig. 17a). Size difference of the chromosomes is also not very pronounced in this species. On the basis of length, they can be classified under two groups: four pairs of medium-sized chromosome (2.0-2.4 μ) of which of one pair is satellited and six pairs of short chromosomes (1.6-1.8 μ). Of these, there are two chromosomes with median, twelve with nearly median, two with submedian and



Figs. 17-26. — *Russelia coccinea*.

Fig. 17a. — Somatic metaphase plate showing 20 chromosomes; $\times 3500$.

Fig. 17b. — Idiogram of the same.

Figs. 18-24. — Metaphase I (polar view) showing different types of secondary association of bivalents; $\times 3500$.

Fig. 25. — Pollen-mother cell at late anaphase I showing the presence of extranuclear bodies; $\times 3500$.

Fig. 26. — Metaphase II (polar view) showing secondary association in 10 chromosomes; $\times 3500$.

four with subterminal centromeres. The somatic chromosomes when analysed in detail, come under the following eight types (Fig. 17b).

Type A - One pair of medium-sized chromosomes (2.4μ) with subterminal centromere and microsatellite at the distal end of the long arm.

Type B - A pair of medium-sized chromosomes (2.4μ) with median centromere.

Types C and D - Two pairs of medium-sized chromosome (2.1 and 2.0μ) with nearly median centromeres. The two pairs are not identical in morphology.

Type E - Two pairs of short chromosome (1.8μ) with nearly median centromeres.

Type F - One pair of short chromosomes (1.8μ) with subterminal centromeres.

Type G - Two pairs of short chromosome (1.7μ) with nearly median centromeres.

Type H - One pair of short chromosomes (1.6μ) with submedian centromeres.

Meiosis. — The meiotic behaviour of this species is quite similar to that of the former one. During diakinesis, various types of terminalization of chiasma have been noted in the 10 bivalents. Size difference in between the bivalents is also not prominent in this species. During metaphase, clear secondary associations has also been observed in these 10 bivalents (Figs. 18-24). Maximum association i.e. the least number of groupings is $2(3) + 2(2)$ which is in corroboration with the former species. The different types of secondary association are presented in Table II.

Disjunction of the chromosomes during metaphase I and II seems to be quite normal (Fig. 26). The occurrence of the extranuclear bodies could also be

TABLE II
Types of secondary association in « Russelia coccinea »

| No. | Configurations | Number of times observed out of 100 clear plates | Maximum association encountered | Units of grouping |
|-----|-------------------------------|--|---------------------------------------|----------------------|
| 1. | 1 (4) + 1 (3) + 1 (2) + 1 (1) | 4 | 4 | |
| 2. | 3 (3) + 1 (1) | 7 | » | |
| 3. | 2 (3) + 2 (2) | 10 | » | 2 (3) + 2 (2) |
| 4. | 1 (4) + 1 (3) + 3 (1) | 14 | 5 | |
| 5. | 2 (3) + 1 (2) + 2 (1) | 13 | » | |
| 6. | 1 (3) + 3 (2) + 1 (1) | 12 | » | |
| 7. | 4 (2) + 2 (1) | 18 | 6 | |
| 8. | 1 (3) + 2 (2) + 3 (1) | 8 | » | |
| 9. | 3 (2) + 4 (1) | 6 | 7 | |
| 10. | 1 (3) + 1 (2) + 5 (1) | 2 | » | |
| 11. | 2 (2) + 6 (1) | 4 | 8 | |
| 12. | 1 (2) + 8 (1) | 2 | 9 | |

encountered in this species (Fig. 25) and their behaviour is similar to those in the former species. Lack of synchronisation in the meiotic divisions of the pollen-mother cells is also noticed in the present material.

DISCUSSION

RAGHAVAN and SRINIVASAN (1940) have determined the chromosome number of two species of *Russelia* and reported $n = 10$ in both of them. The present investigation showing $2n = 20$ and $n = 10$, thus, are in corroboration to the above record. $2n = 20$ and/or $n = 10$ chromosome numbers are also reported in several other genera of the family Scrophulariaceae, such as *Tozzia*, *Odontites* (WITSCH 1932), *Limosella* (VACHELL and BLACKBURN 1939) *Tetranema* (SUGIURA 1940) *Angelonia* (RAGHAVAN and SRINIVASAN 1940) and *Diplacus* (MCMINN 1951).

In general, the somatic chromosomes in *R. equisetiformis*, as found in the present investigation, are of moderate size ($2.4-4.2 \mu$) but in *R. coccinea* they are much smaller ($1.6-2.4 \mu$). It may be mentioned here, that the method of pre-treatment of the root tips was similar in both the species investigated.

In *R. equisetiformis* there are two pairs of satellited chromosomes in the somatic set, whereas in *R. coccinea* only one such pair could be encountered. The idiogramatic representation of the two species studied shows some other dissimilarities in the detail morphology of the somatic chromosomes.

The meiotic data indicate that the chromosome number $n = 10$ is a derived one, originating from a much lower basic number. Secondary association of bivalents has been noted in both species and worked out in detail. The bivalents, in general, show a profound tendency to associate together and the percentage of groupings was found to be very high. If the theory of secondary association is considered to be a correct means of ascertaining phylogeny, the ancestral forms of the present materials seem to have contained four chromosomes in their haploid set. The absence of any multivalent formation suggests that they are either allopolyploids or the chromosomes after autopolyploidy were subjected to much structural changes. In this connection it may be mentioned here that the 'diploid' *Calceolarias* ($n = 9$), where the basic number has been determined as to be four only were also considered to be allopolyploids by SRINATH (1940a). *Angelonia* has also been referred to as an allotetraploid genus (RAGHAVAN and SRINIVASAN 1940).

Lack of synchronisation in the meiotic divisions in the anthers appears to be a regular feature in the present materials. Similar characteristic of 'timing unbalance' have also been recorded in two other genera of the family Scrophulariaceae viz. *Hebe* (FRANKEL 1940) and *Striga* (TIAGI 1956). In *H. townsoni*, FRANKEL (1940) observed such phenomenon, as well as some irregularities in the meiotic divisions associated with the male sterility. In the present materials,

however, the structure and behaviour of the chromosomes are fairly normal and it appears that the sterility of these plants is not due to any cytological irregularity. During further development in the anther a great majority of the growing pollen grains degenerate. There is also a high percentage of mortality in the growing female gametophytes. These will further be discussed in a separate communication (PAL 1961).

The presence of some extranuclear bodies has been detected in the cytoplasm of many pollen-mother cells. These bodies whenever present, vary in number and size in different cells and are Feulgen-negative in reaction. Such non-chromatic bodies in the cytoplasm were also found by POLLISTER and LAVIN (1944), DUTT (1949), SHARMA (1955) and BANERJI and SEN (1956). In some other materials, however, similar structures were found to be Feulgen-positive in nature (SHEFFIELD 1941; LUDFORD 1942). PAINTER (1943) observed that such bodies generally appears in the cytoplasm only after the breaking down of the nuclear membrane and these disappear with the increase in the nucleic acid content of the cytoplasm. SPARROW and HAMMOND (1947), on the other hand, noted the transference of some chromatic bodies from the nucleus to the cytoplasm during prophase in the cells of certain plants. These workers opined that in healthy cells, under limited conditions, the extranuclear bodies have got profound significance in cell metabolism. This idea was later supported by SHARMA (1955). It is interesting to note that SPIEGELMAN and KAMEN (1946) have suggested that the genes continually produce partial replicas of themselves which enter the cytoplasm. These replicas are nucleoproteins in nature and are selfduplicating and as such can control the type and amount of protein and enzyme synthesis in the cells.

TISCHLER (1934), SHEFFIELD (1941) and LUDFORD (1942), however, are of the opinion that these extranuclear bodies are produced as a result of the influence of some abnormal environmental conditions or some infections. The present observation in two species of *Russelia* (and also in *Millettia ovalifolia* Kurz. PAL 1960), seems to be in support to this hypothesis and as such, it is difficult to state the exact role, if any, these cytoplasmic bodies play in the metabolic activities of the cell. Moreover, it may be pointed out, that the occurrence of such extranuclear bodies is recorded in only a very limited number of plants and secondly when occurring, their presence may not be universal in all the cells of the tissue as is observed in the present material.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincerest thanks to Dr. I. BANERJEE, D. Sc., F.N.I., F.A. Sc., for his kind interest in the present investigation. This work has been carried out at the Botany Laboratory, University of Calcutta.

REFERENCES

- BANERJI I. and SEN S., 1956. — *The somatic and meiotic chromosomes of Kalanchae pinnata (Lamark) Persoon*. Caryologia, **8**: 195-204.
- BOR N. L. and RAIZADA M. B., 1946. — *Some beautiful Indian climbers and shrubs*. Jour. Bomb. Nat. Hist. Soc., **46**: 411-413.
- DARLINGTON C. D. and WYLIE A. P., 1955. — *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. George Allen & Unwin Ltd., London.
- DUTT M., 1949. — *Cytogenetics of some ornamental Jasmines*. Abstract. Proc. 36th Indian Sci. Congr.
- FRANKEL O. H., 1940. — *Studies in Hebe. II. The significance of male sterility in the genetic system*. Jour. Genet., **40**: 171-184.
- LUDFORD R. J., 1942*. — *Pathological Aspects of Cytology*. Oxford Univ. Press, London.
- McMINN H. E., 1951. — *Studies in the genus Diplacus (Scrophulariaceae)*. Madrono, **11**: 33-127.
- PAINTER T. S., 1943. — *Cell growth and nucleic acids in the pollen of Rhoeo discolor*. Bot. Gaz., **105**: 58-68.
- PAL N., 1960. — *Cytological studies in Millettia ovalifolia Kurz*. Phyton, **15**: 97-101.
- , 1961. — *Gametogenesis and the factors of sterility in Russelia equisetiformis Schlecht et Cham. and R. coccinea (Linn.) Wettst.* In press.
- POLLISTER A. W. and LAVIN G. I., 1944. — *Possible conversion of chromonucleic acid during atypical spermiogenesis of Viviparus malleatus Reeve*. Anat. Rec., **89**: 557-558.
- RAGHAVAN T. S. and SRINIVASAN V. K., 1940. — *Studies in the Scrophulariaceae. I. The cytology of Angelonia grandiflora C. Morr. and some related genera*. Cytologia, **11**: 37-54.
- RAIZADA M. B., 1958. — *Name changes in common Indian Plants*. Ind. Forester, **84**: 467-538.
- SHARMA A. K., 1955. — *Cytology of some of the members of Commelinaceae and its bearing on the interpretation of phylogeny*. Genetica, **27**: 323-363.
- SHARMA A. K. and SIRCAR S. K., 1955. — *A new technique for the study of chromosomes of Palm*. Nature, **176**: 261.
- SHEFFIELD F. M. L., 1941. — *The cytoplasmic and nuclear inclusions associated with severe etch virus*. Jour. Roy. Micros. Soc. Lond., Ser. III, **61**: 30-45.
- SPARROW A. H. and HAMMOND M. R., 1947. — *Cytological evidence for the transfer of desoxyribose nucleic acid from nucleus to cytoplasm in certain plant cells*. Amer. Jour. Bot., **34**: 439-445.
- SPIEGELMAN S. and KAMEN M. D., 1946. — *Genes and nucleoproteins in the synthesis of enzymes*. Science, **104**: 581-584.
- SRINATH K. V., 1939*. — *Morphological and cytological studies in the genus Calceolaria. IV. The somatic chromosomes*. Zeitschr. indukt. Abstamm. Vererbungslehre. B, **77**: 104-134.
- , 1940a. — *Morphological and cytological studies in the genus Calceolaria. II. Meiosis in diploid and aneuploid Calceolarias*. Cytologia, **10**: 467-491.
- , 1940b. — *Morphological and cytological studies in the genus Calceolaria. III. Meiosis in a triploid Calceolaria*. Ann. Bot., New Series, **4**: 81-106.
- SUGIURA T., 1940. — *Studies on the chromosome numbers in higher plants IV*. Cytologia, **10**: 324-333.
- TIACI B., 1956. — *A contribution to the embryology of Striga orobanchoides Benth. and Striga euphrasioides Benth.* Bull. Torrey Bot. Club, **83**: 154-170.

* Not seen in original.

- TISCHLER G., 1934. — *Allgemeine Pflanzenkaryologie in Handbuch der Pflanzenanatomie* edited by K. Linsbauer. Bd. II. Gebrüder Borntraeger, Berlin.
- VACHELL E. and BLACKBURN K. B., 1939. — *The Limosella plants of Glamorgan*. Jour. Bot., **77**: 65-71.
- WITSCH H., 1932. — *Chromosomenstudien an mitteleuropäischen Rhinantheen*. Öst. bot. Zeitsch., **81**: 108-141.

SUMMARY

In the present paper, the morphology of the somatic chromosomes and meiotic behaviour of *Russelia equisetiformis* Schlecht et Cham. and *R. coccinea* (Linn.) Wettst. has been described in detail and discussed.

The chromosome number is $2n = 20$ and $n = 10$ in both species. The chromosomes in *R. equisetiformis* are larger in size and fall under nine types out of which two pairs (type A and type C) are satellited. The somatic complement of the other species (*R. coccinea*) however, has only one pair of satellited chromosomes (type A). The chromosomes, in this species can be classified in eight types only.

The meiotic division is fairly normal in both species. A high degree of secondary association of bivalents has been observed and the maximum association was found to be $2(3) + 2(2)$ indicating the basic number as four only.

Lack of synchronisation in the meiotic division in the anthers of a flower was found to be characteristic in the two species studied. The presence of non-chromatic extranuclear bodies, specially in the pollen mother cells of infected flower buds has been observed.

RIASSUNTO

Nel presente lavoro viene dettagliatamente descritta e discussa la morfologia dei cromosomi somatici e il comportamento meiotico di *Russelia equisetiformis* Schlecht et Cham. e di *Russelia coccinea* (L.) Wettst.

Il numero cromosomico è per ambedue le specie $2n = 20$ e $n = 10$. In *R. equisetiformis* i cromosomi sono più grandi e sono classificabili in nove tipi, tra i quali due paia (il tipo A e il tipo C) sono satellitati. Il kariogramma dell'altra specie (*R. coccinea*) tuttavia presenta solo un paio di cromosomi satellitati (tipo A). I cromosomi in questa specie possono essere classificati solo in otto tipi.

La meiosi è normalissima in entrambe le specie. È stato osservato un alto grado di associazione di bivalenti; l'associazione massima trovata $2(3) + 2(2)$ indica che il numero base è soltanto 4.

Nelle due specie studiate è stata riscontrata una caratteristica mancanza di sincronismo nelle divisioni meiotiche delle antere di un fiore. È stata osservata la presenza di corpi non cromatici extranucleari, specialmente nelle cellule madri del polline di alcuni bocci infetti.

SUL NUMERO CROMOSOMICO DEL *CUCUMIS* COLTIVATO NELLE PUGLIE CON IL NOME DI « CAROSELLO »

F. MACCHIA e G. PACUCCI

Istituto di Botanica e Istituto di Agronomia dell'Università, Bari

In Redazione: il 15 Novembre 1960*

È noto nelle Puglie col nome dialettale che, italianizzato, suona « Carosello », un prodotto orticolo costituito dai frutti acerbi di una cucurbitacea, destinata al consumo fresco e comunemente assimilata, per il suo impiego, ai cetrioli. Il « Carosello » è diffusamente coltivato in Puglia, specialmente nella provincia di Bari e non ci risulta che sia noto altrove. I suoi frutti sono normalmente oblungo-cilindrici, con solchi longitudinali poco profondi, di colore verde piuttosto chiaro, specie lungo i solchi, e ricoperti da fitta e molle peluria; la polpa è abbondante e soda. Circa i caratteri organolettici il « Carosello » è dolce, sapido e a polpa croccante.

Sebbene ci sia stata tramandata notizia dal DE ROSA che in Puglia intorno al 1900 veniva utilizzato per il consumo fresco il frutto immaturo del *Cucumis melo* L., non ci risulta che il « Carosello » sia stato finora ben studiato dal punto di vista sistematico. In realtà l'esame morfologico della pianta del « Carosello » porta ad attribuire questa cucurbitacea alla specie *Cucumis melo*, mentre il comune cetriolo è concordemente attribuito alla specie *Cucumis sativus* L.

La classificazione in base ai caratteri morfologici è stata condotta sulla monografia di COGNIAUX e HARMS (1924). A completamento ed a definitiva conferma della determinazione sistematica, si è ritenuto opportuno procedere alla determinazione del numero cromosomico del « Carosello » e, per confronto, di quello del melone e del cetriolo. Per queste due specie, infatti, DARLINGTON e WYLIE (1955) riportano le seguenti determinazioni:

Cucumis sativus L. $2n = 14$, determinato da HEIMLICH, 1927

Cucumis melo L. $2n = 24$, " " YAMAHA e SINOTO, 1936

I numeri $n = 7$ per *Cucumis sativus* e $n = 12$ per *Cucumis melo* risultano confermati da MC KAY (1930) e da WITHAKER (1930, 1932).

Allo scopo di procurarci il materiale per l'esame microscopico, sono stati posti a germinare su carta bibula e in capsule Petri alla temperatura di 25° semi di melone della cultivar « Gialletto Brindisino », di cetriolo della cultivar « Polignano » e di

* Lavoro pubblicato con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

« Carosello » Barese. Quando le radichette avevano raggiunto la lunghezza di 4-6 cm furono prelevati gli apici radicali e caulinari e fissati in Carnoy (3 p. alcool assoluto ed 1 p. acido acetico) per un tempo di 8'-10', essendosi avuti per tempi superiori ed inferiori risultati non soddisfacenti; l'idrolisi fu fatta a freddo con acido cloridrico al 18,2%.

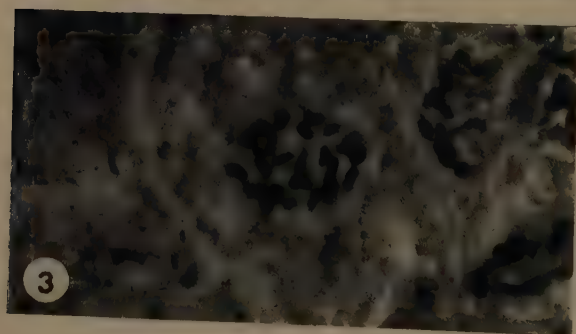
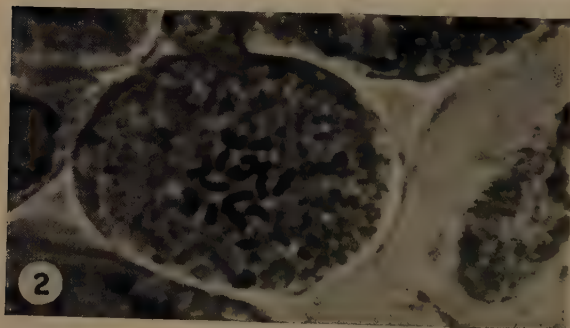
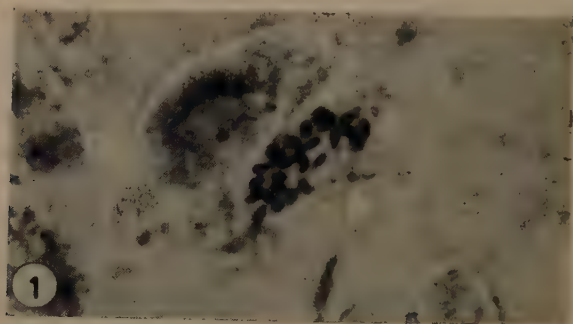


Fig. 1. — *Cucumis melo* L.: $2n = 24$.

Fig. 2. — *Cucumis sativus* L.: $2n = 14$.

Fig. 3. — « Carosello » (*Cucumis melo* L. var.): $2n = 24$.

la colorazione fu ottenuta con Feulgen all'1%. I preparati furono lutati e conservati per alcuni giorni secondo la tecnica di BATTAGLIA (1957). Il materiale fu fissato in varie ore del giorno e i periodi tra le 5 e le 6 e tra le 18 e le 19 dettero i migliori risul-

tati; il periodo tra le ore 11 e le 12 mostrò invece l'esistenza di un minimo di cellule in divisione.

I risultati dell'analisi kariologica sono riportati nelle figure 1, 2, 3 e da esse risultano i seguenti numeri cromosomici per le entità osservate:

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Melone (<i>Cucumis melo</i>) | $2n = 24$ |
| Cetriolo (<i>Cucumis sativus</i>) | $2n = 14$ |
| Carosello | $2n = 24$ |

Si può concludere confermando anche sulla base del numero dei cromosomi che il « Carosello » è una delle numerose varietà della specie *Cucumis melo* L.

La notevole differenza apparente tra melone e « Carosello » nei riguardi dei caratteri morfologici deve essere quindi attribuita alla ben nota grande variabilità della specie *C. melo*.

BIBLIOGRAFIA

- BATTAGLIA E., 1957. — *Conservazione in frigorifero dei preparati temporanei lutati, di materiale colorato secondo il metodo Feulgen*. Caryologia, **10**: 159-160.
- COGNIAUX A. und HARMS H., 1924. — *Cucurbitaceae-Cucurbiteae-Cucumerinae*. In: ENGLER A. *Das Pflanzenreich*, n. **88**, IV, 275, II.
- DARLINGTON C. D. and WYLIE A. P., 1955. — *Chromosome Atlas of Flowering Plants*. George Allen and Unwin Ltd, London.
- MC KAY J. W., 1930. — *Chromosome numbers in the Cucurbitaceae*. Bot. Gaz., **89**: 416-417.
- WHITAKER T. W., 1930. — *Chromosome numbers in the cultivated cucurbits*. Amer. Jour. Bot., **17**: 1033-1040.
- , 1932. — *Cytological and Phylogenetic studies in the Cucurbitaceae*. Bot. Gaz., **94**: 759-790.

SUMMARY

The chromosome number of the Cucurbitacea named *Carosello* cultivate in Puglia confirms the assumption that this cultivar is a variety of *Cucumis melo* L. (melon) and not of *Cucumis sativus* L. (cucumber).

RIASSUNTO

Il numero dei cromosomi conferma che il « Carosello », una sorta di cetriolo coltivato in Puglia, è una varietà di *Cucumis melo* L. (melone) e non di *Cucumis sativus* L. (cetriolo).



CHROMOSOME MORPHOLOGY DURING THE SPERMATOGENESIS OF *ODONTOTERMES REDEMANNI* (WASMANN)

BARUNDEB BANERJEE

Division of Graduate Studies, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, U.S.A.

Received: 14th February 1961

INTRODUCTION

Studies on the structure of the chromosomes and their behaviors during the different phases of the cellular growth and development are rather rare among the termites, though such a study is bound to be proved very much useful in the proper evaluation of the different forces acting upon them in the differentiation of the caste system (STELLA and GHIDINI 1942).

A review of the literature indicates that except for the works of BENKERT (1930, 1930a, 1933) and STELLA (1936, 1938, 1939, 1939a) on the different aspects of the cytological behavior of the chromosomes in *Reticulitermes*, and that of GRASSE (1937a) and STEVEN'S (1905) works on *Zootermopsis*, we have practically very little information on cytological behavior of the gonadial and other somatic cells in termites. Among the Indian species of termites, there is practically no record of any chromosomal study except for the present author's observations (BANERJEE 1957) on the chromosome complex in *Odontotermes redemanni* (Wasmann). In the present paper some further observations on the behavior and morphology of the chromosomes are being reported.

MATERIALS AND METHOD

De-alate males of *Odontotermes redemanni* (Wasmann) were collected for the purpose of the present study and the dissected testes were fixed in Flemming's solution and also in Corrosive and Sublimate Acetic acids. Sections were cut by usual procedure at 7 μ and were stained with Heidenhain's haematoxylin either alone or with orange G. Squashes were also prepared by fixing the testes in Aceto-Alcohol (1:1).

OBSERVATIONS

The pair of the tests lie in the intersegmental membrane between the 7th and the 8th sternite and may be differentiated into an upper, middle and lower zone depending on the physiological set up of the cells. The apical zone is primarily occupied by the cells that may be described as the spermatogonial resting

cells. These cells are specially distinguishable by the presence of a deeply stained body near the nucleus, which may be described as the plasmosome (Fig. 11, PLSM). The nucleus is also characterized by the presence of a number of very finely stained bodies, which are probably the pro-chromosomes. Some of the cells in this region are found to be in the prophase stage, when the chromosomes become distinctly visible in the nucleus (Fig. 2). In the cells at the metaphase stage in this region, the chromosomes become distinctly visible, and appear as deeply stained bodies from the tangled mass of spindle (Fig. 3).

In the middle zone the cells are found to be at various stages of meiosis. However, most of them are found to be at the early prophase stage of the primary spermatocyte. The chromosomes in these cells are found to occupy the central region of the nucleus as a clump of deeply stained threads. Following this stage the chromosomes become contracted from the clump to occupy one region of the nucleus, keeping the other end optically empty. It is during this stage that some of the chromosomes take up their bivalent characteristics, some being twisted in the form of horns, and a few appear as separate rods, while the others are joined in pairs by constriction. In the total view the bivalents appear as dense crowd, heaped on the primary spermatocyte metaphase plate (Fig. 6).

Towards the basal zone of the testes, anaphase I predominates. At the anaphase I the chromosomes are seen segregated on the opposite poles of the dividing nucleus, though the daughter nuclei still remain enclosed within the same mass of cytoplasm, a case which is rarely encountered among the insects (Fig. 7). It seems that there is no interkinensis between the first and the second meiotic divisions, and that each half of the nucleus divides directly into two, giving rise to four spermatids. This picture however, is not always clear, because some of the spermatids remain in different planes, and therefore lesser number of spermatids (3,2) come into view (Figs. 8, 9, 10). During the later stages of spermatogenesis, the chromosomes again become clustered together to such an extent that it often becomes difficult to detect their individual nature.

CONCLUSION

The spermatogenesis and the associated chromosomal changes in *Odontotermes redemanni* (Wasmann) are unique in many features, specially in the formation of the sperm tetrad in the lower zone of the testes. The identical phenomenon has also been reported by STEVENS (1905) in *Reticulitermes*. Atypical spermatogenesis in *Bellicositermes* has been described by GRASSE and BONNEVILLE (1936). The present observation differs from the earlier ones in the details of the chromosomal behavior in spermatogenesis. Further in the absence of fertile soldiers and workers in the present species, spermatogenesis in a de-alate male is being reported for the first time.

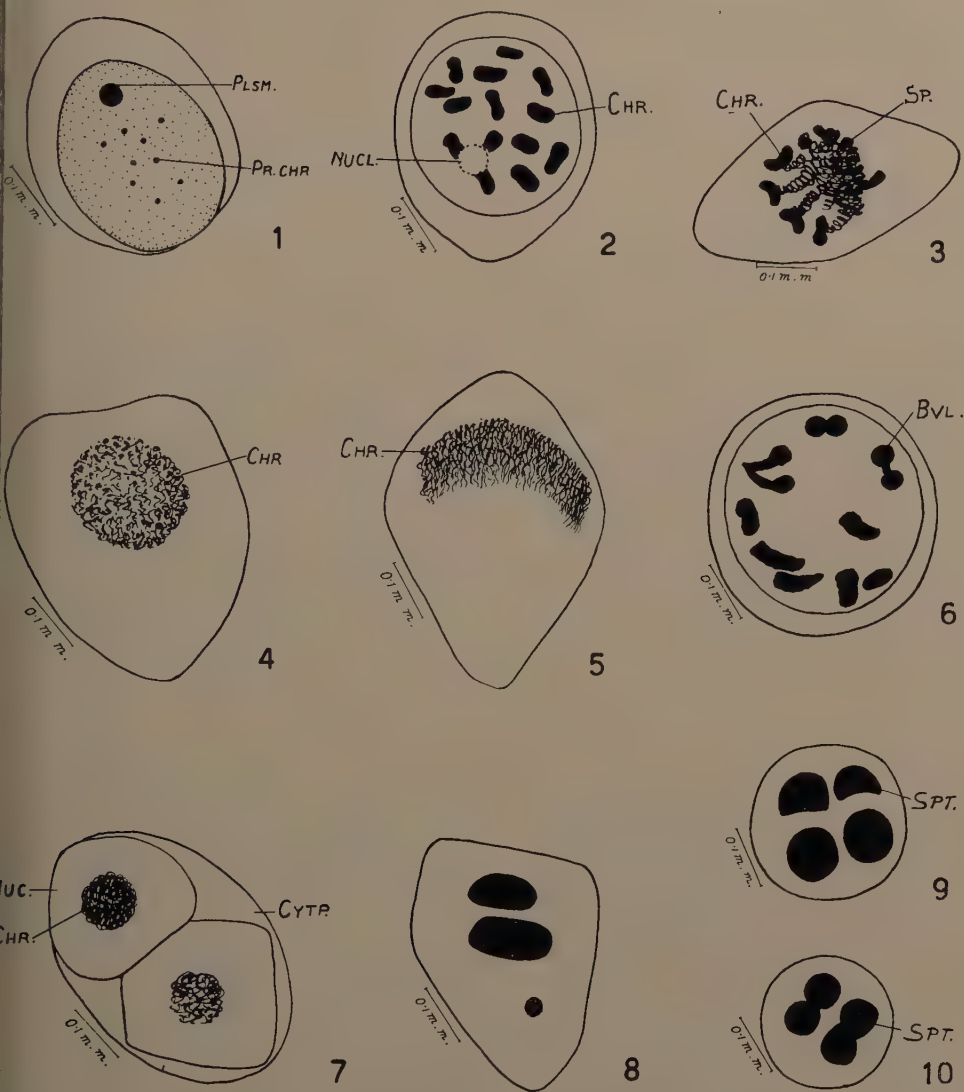


Fig. 1. — A spermatogonial resting cell. PLSM: Plasmosome; PR.CHR: Pro-Chromosomes.

Fig. 2. — Spermatogonial prophase stage. CHR: Chromosome; NUCL: Nucleolus.

Fig. 3. — Spermatogonial metaphase stage. Letterings same as in Fig. 2.

Fig. 4. — Early stage of Spermatocyte prophase. Lettering same as Fig. 2

Fig. 5. — Late stage of Spermatocyte prophase. Lettering same as Fig. 2.

Fig. 6. — Diakinesis stage. BVL: Bivalents.

Fig. 7. — Anaphase I stage. CYTP: Cytoplasm; NUC: Nucleus.

Fig. 8. — Telophase stage.

Figs. 9 and 10. — Formation of sperm tetrad. SPT: Spermatid.

REFERENCES

- BANERJEE B., 1957. — *Haploid chromosome numbers in the testes of the termite king, Odontotermes redemanni* (Wasmann). *Curr. Sci.*, **26**: 288-289.
- BENKERT J. M., 1930. — *Chromosomal study of Reticulitermes flavipes*. *Proc. Pennsylvania Acad. Sci.*, **4**: 1-3.
- , 1930a. — *Chromosome number of the male of the first form reproductive of Reticulitermes flavipes* Koll. *Proc. Pennsylvania Acad. Sci.*, **4**: 97-99.
- , 1933. — *Comparison of the chromosomes of soldier and king of Reticulitermes flavipes* Koll. *Proc. Pennsylvania Acad. Sci.*, **7**: 121-122.
- GRASSÉ P. P., 1937. — *La Spermatogenèse aberrante des Metatermitides*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **204**: 1677-1679.
- GRASSÉ P. P. and BONNEVILLE P., 1936. — *La Spermatogenèse abortive ou atipique chez la termite du Natal. (Bellicositermes natalensis Smeth.)*. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **122**: 1009-1010.
- STELLA E., 1936. — *Sulla maturazione delle gonadi nelle termiti italiane. I. Reticulitermes lucifugus. II. Calotermes flavicollis*. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **11**: 731-734.
- , 1938. — *Ricerche citologiche sui neutri e sui riproduttori delle termiti italiane, Calotermes flavicollis e Reticulitermes lucifugus*. *Rend. Acad. Naz. Lincei*, **7**: 30.
- , 1939. — *Studi sulle termiti. I. Comportamento citologico delle gonadi in operai di Reticulitermes lucifugus*. *Riv. Biol. Colon.*, Roma, **2**: 81-95.
- , 1939a. — *Studi sulle termiti. 4. Alcuni dati citologici sulle gonadi di soldati di Bellicositermes bellicosus* (Smeath). *Rev. Biol. Colon.*, Roma, **2**: 255-262.
- STELLA E. and GHIDINI G. M., 1942. — *Regression of the gonads and the evolution of the sterile castes in the termites*. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, **47**: 825-831.
- STEVENS N. M., 1905. — *Studies in spermatogenesis with special reference to the accessory chromosomes*. *Carnegie Inst. Washington Publ.*, **36**: 1-32.

SUMMARY

A general account of the important morphological features of the haploid chromosome during the spermatogenesis in the termite, *Odontotermes redemanni* (Wasmann) has been described. The behavior of the chromosomes in this species vary in many important points from the generalized picture and is interesting specially due to the formation of the spermatetrad at the end of the spermatogenesis.

RIASSUNTO

Si dà una descrizione generale delle importanti caratteristiche morfologiche del corredo aploide durante la spermatogenesi della termite *Odontotermes redemanni* (Wasmann). Il comportamento dei cromosomi in questa specie si distacca, per molte particolarità, dallo schema normale ed è interessante specialmente per la formazione della tetrade di spermi alla fine della spermatogenesi.

CYTOLOGICAL STUDIES ON *MORUS INDICA* L. AND *MORUS LAEVIGATA* WALL.

B. C. DAS

Central Sericultural Research Station, Berhampore, West Bengal, India

Received: 1st October 1960

INTRODUCTION

Mulberry is a useful economic plant which serves as the only food plant of mulberry silkworms. Its cytology has scarcely been studied in detail in India, as such Indian literature on this aspect of the plant is scanty. TAHARA (1910), OSAWA (1920) and SINOTO (1929) reported chromosome numbers of a few species occurring mostly in Japan and tropical Asia. DATTA (1954) reported chromosome numbers of a few varieties of *Morus indica* and studied only mitosis of *Morus laevigata*. The present work was started with a view to studying cytology of Indian mulberry in detail.

MATERIALS AND METHODS

Morus indica Linn. is a monoecious plant. It is widely cultivated in India for feeding silkworms. The present material was collected from the experimental farm of the Central Sericultural Research Station, Berhampore (West Bengal). *Morus laevigata* Wall. is a dioecious plant occurring in wild and cultivated forms in the Eastern Himalayas. The present material was collected from a locality of Kalimpong at an altitidine of 4,200 ft.

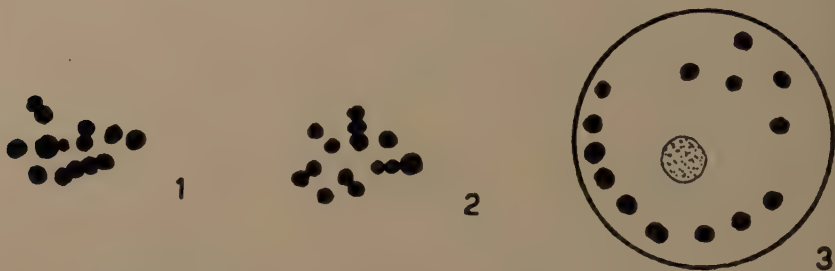
Flower buds of suitable size were collected and fixed in Nawaschin A and B in equal proportion with pretreatment in Carnoy's fluid for a few seconds. Following usual methods of dehydration and infiltration, paraffin blocks were made. Microtome sections of 12μ thickness were stained in 1% crystal violet solution and permanent slides were prepared for microscopic observation.

All the figures were drawn with a drawing prism giving a total magnification $3,000\times$ approximately.

OBSERVATIONS

In *Morus indica* L. there are 14 clear bivalents in metaphase I, confirming the previous report of $2n = 28$ chromosomes. One bivalent was found to be larger as compared to others. The characteristic feature of meiosis is the occurrence of secondary associations of bivalents in metaphase I. From different types of secon-

dary associations as recorded in Table I, the maximum association of bivalents was found out, which indicates 7 as basic set.

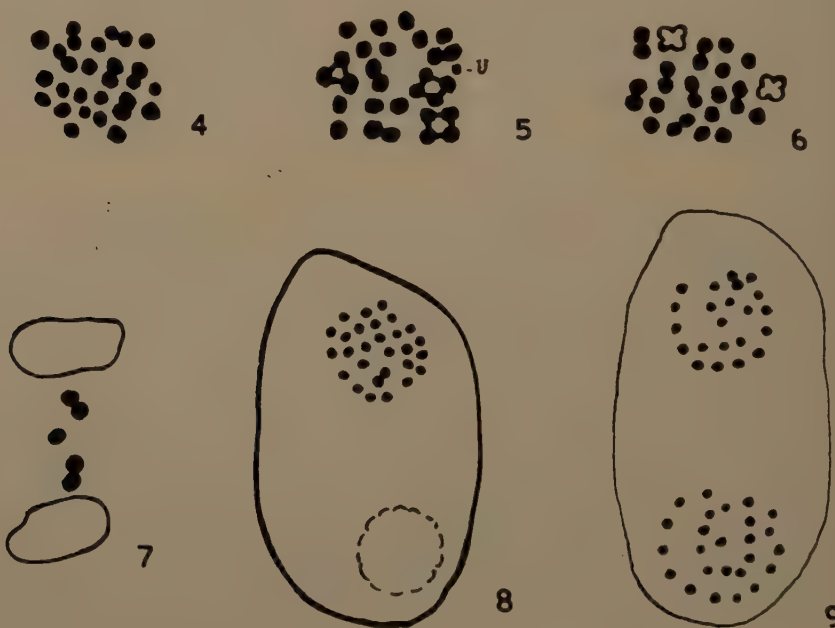


Figs. 1-3. — *Morus indica* L.

Fig. 1. — Polar view metaphase I showing secondary association of bivalents with 1(4) + 3(2) + 4(1).

Fig. 2. — Polar view of metaphase I showing secondary association of bivalents with 2(3) + 2(2) + 4(1).

Fig. 3. — Diakinesis showing $n = 14$.



Figs. 4-9. — *Morus laevigata* Wall.

Fig. 4. — Polar view metaphase I showing $n = 28$ chromosomes.

Fig. 5. — Polar view metaphase I showing 17 bivalents + 2 tetravalents + 1 trivalent and 1 univalent, thus it deviates from normal chromosome number of $2n = 56$. U: univalent.

Fig. 6. — Polar view metaphase I showing 24 bivalents and 2 tetravalents.

Fig. 7. — Anaphase I showing laggings.

Fig. 8. — Early metaphase II showing 28 univalents.

Fig. 9. — Early metaphase II showing unequal No. of univalents in diads.

TABLE I

| Sl. No. | Different types of secondary association | No. of times observed out of 100 plates | Units of groups | Maximum association |
|---------|--|---|-----------------|---------------------------|
| 1. | 1(4) + 4(2) + 2(1) | 10 | 7 | |
| 2. | 5(2) + 4(1) | 10 | 9 | |
| 3. | 1(3) + 3(2) + 5(1) | 8 | 9 | |
| 4. | 1(3) + 4(2) + 3(1) | 10 | 8 | |
| 5. | 1(4) + 3(2) + 4(1) | 8 | 8 | |
| 6. | 4(2) + 6(1) | 14 | 10 | |
| 7. | 1(3) + 2(2) + 7(1) | 4 | 10 | |
| 8. | 1(4) + 2(2) + 6(1) | 4 | 9 | |
| 9. | 2(3) + 2(2) + 4(1) | 4 | 8 | 1(4) + 1(3) + 2(2) + 3(1) |
| 10. | 3(2) + 8(1) | 6 | 11 | |
| 11. | 2(2) + 10(1) | 4 | 12 | |
| 12. | 1(4) + 1(3) + 1(2) + 4(1) | 2 | 7 | |
| 13. | 1(5) + 1(2) + 7(1) | 2 | 9 | |
| 14. | 2(3) + 2(2) + 4(1) | 2 | 8 | |
| 15. | 1(5) + 1(4) + 1(2) + 4(1) | 4 | 7 | |
| 16. | 1(4) + 1(3) + 2(2) + 3(1) | 2 | 7 | |
| 17. | 1(3) + 4(2) + 3(1) | 6 | 8 | |
| 18. | 6(2) + 2(1) | 2 | 8 | |

Morus laevigata Wall. was found to be tetraploid having $n = 28$ chromosomes. DARLINGTON and WYLIE mentioned it as diploid. DATTA reported it as tetraploid having $2n = 56$ chromosomes. The following peculiarities were observed in I and II divisions of PMCs:

- I) Number of bivalents was not constant in different PMCs;
- II) Occurrence of multivalents;
- III) Presence of laggards due to late separation in anaphase I;
- IV) Irregular separation of chromosomes due to presence of multivalents.

DISCUSSION

M. indica L. behaves normally in meiosis except the presence of secondary grouping which indicates its allopolyploid origin. Since secondary association of bivalents indicates 7 as basic set, at its present level it can be considered as an allotetraploid. Presence of multivalents as referred to by DATTA in this species could not be seen in the individuals studied by the present author.

In *M. laevigata* Wall. presence of multivalents, irregular separation of chro-

mosomes may be an indication of the unbalanced polyploid state of the species. Inconstancy in chromosome numbers in PMCs may arise out of premeiotic irregularities or abnormalities originating in the somatic cell. In view of possibilities of study on somatic lines investigations in this direction are in progress.

ACKNOWLEDGMENT

I am very much indebted to Dr. A. K. SHARMA, my esteemed teacher, for giving me guidance in the work and going through the manuscript. I am also thankful to SHRI S. K. MUKHERJEE, Botanist, Central Sericultural Research Station for his taking keen interest in the work. Thanks are also due to Dr. D. P. RAICHOUDHURY, Director of Research of this Research Station for providing me with necessary facilities and continued encouragement.

REFERENCES

- DARLINGTON C. D. and JANAKI AMMAL E. K., 1945. — *Chromosome Atlas of cultivated plants*. George Allen & Unwin Ltd., London.
- DARLINGTON C. D. and WYLIE A. P., 1955. — *Chromosome Atlas of flowering plants*. George Allen & Unwin Ltd., London.
- DATTA M., 1954. — *Cytogenetical studies on two species of Morus*. *Cytologia*, **19**: 86-95.
- OSAWA S., 1920 *. — *Journal Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*, **4**: 83-116.
- SINOTO Y., 1929. — *Chromosome studies in some dioecious plants, with special reference to the allosomes*. *Cytologia*, **1**: 109-191.
- TAHARA M., 1909 *. — *Bot. Mag. Tokyo*, **23**: 343.

SUMMARY

The meiotic numbers of *Morus indica* L. and *Morus laevigata* Wall. were confirmed to be as $n = 14$ and $n = 28$ respectively. Secondary association of bivalents indicates 7 as basic number. In *M. laevigata* the following peculiarities were noted in its meiotic behaviour:

- I) presence of multivalents and laggards;
- II) irregular separation of chromosomes;
- III) unequal numbers of chromosomes in different PMCs.

The allopolyploid nature of *M. indica* and polyploid state of *M. laevigata* have been suggested.

RIASSUNTO

Viene confermato che i numeri cromosomici meiotici di *Morus indica* L. e di *Morus laevigata* Wall. sono rispettivamente $n = 14$ e $n = 28$. L'associazione secondaria dei bivalenti indica 7 quale numero base.

In *M. laevigata* sono state notate le seguenti caratteristiche relativamente al comportamento meiotico:

1. presenza di multivalenti e di cromosomi ritardatari;
2. separazione irregolare dei cromosomi;
3. numeri cromosomici diversi in differenti CMP (cellule madri del polline).

È stata supposta la natura allopoliploide di *M. indica* e lo stato poliploide di *M. laevigata*.

* Not consulted in original.

NEW DATA ON CHROMOSOME BREAKAGE BY ACRIDINE ORANGE IN THE *ALLIUM* TEST

VITTORIA NUTI-RONCHI and FRANCESCO D'AMATO

Istituto di Genetica della Università, Pisa

Received: 30th April 1961^{*}

In 1950, D'AMATO showed that tap water solutions of acridine orange can induce chromosome breakage and reunion in the *Allium* test (root tips of onion bulbs). D'AMATO's experiments were carried out at room temperature and in the ordinary conditions of diurnal laboratory illumination, using colorless glass flasks. In these conditions, both chromatid and chromosome breakage were obtained, the chromosome-breaking effect of the substance occurring in the range from 2,000 to 2 ppm ($7,500 - 3,7 \times 10^{-6}$ M/l). Recently, KIHLMAN 1959a, b), working on the root-tips of *Vicia faba*, demonstrated that acridine orange is inactive in the absence of light, whilst a radiomimetic effect is observed in roots pretreated for 20 hours in the dark with $3.5 - 5 \times 10^{-6}$ M/l solutions of acridine orange and illuminated for 45 and 60 minutes in a M/150 phosphate buffer solution in presence of oxygen (20 and 100% in the gas phase). On account of these results, KIHLMAN suggested that, in D'AMATO's experiments too, the radiomimetic effect of acridine orange might be due « to its ability to act as a photosensitizing agent » (KIHLMAN 1959a). Therefore, a reinvestigation of the cytological effect of acridine orange in the *Allium* test seemed to be desirable.

In a first series of experiments, rapidly growing onion roots, treated in the dark with acridine orange solutions from 100 to 5 ppm ($370 - 18,5 \times 10^{-6}$ M/l) for 4 or 24 hours, were transferred for « recovery » into tap water in the absence of light and the root-tips fixed at 24-hour intervals. Following a mitosis-free period of different duration in different treatments, a good proportion of the mitoses of the recovery cycle showed structural changes, mostly of the chromosomal type. In addition to chromosome fragments — the most common aberration — dicentrics, centric and acentric rings were not rare, as indicated by the « reunion index », i.e. the percentage of B's undergoing reunion (Table I).

In order to decide for a possible photodynamic effect of acridine orange in the *Allium* test, it was considered essential first to reproduce KIHLMAN's results on *Vicia faba*. Using an italian broad bean variety and following in all details the experimental procedure described by KIHLMAN (1959a, c), it was possible to obtain

^{*} This investigation was supported by a grant from the « Consiglio Nazionale delle Ricerche », Rome.

types and frequencies of chromosome structural changes comparable to those reported by him. A series of experiments was then carried out on onion roots pretreated with dilute solutions of acridine orange for 20 hours in the dark and illuminated from both sides with 24 V, 150 W « Attralux » lamps for 40 minutes in a M/150 phosphate buffer solution in which either air or pure oxygen was bubbled. During illumination, the « Lucite » vessel containing the buffer solution was immersed in running water to keep the solution temperature at 15-16° C. Between the light sources and the roots there were, on each side, 10 cm air, 1 cm « Lucite » and 5 cm water. A killing effect was induced by a 40

TABLE I

Cytological effects observed in onion roots grown in tap water after treatment with acridine orange solutions (experiments in the dark). Aberrations scored in the mitotic cycle following the mitosis-free period. B'' and B': chromosome and chromatid break resp. Reunion index: percentage of B''s undergoing reunion.

| Acridine orange treatment (conc: $\times 10^{-6}$ M/l) | Duration of mitosis-free period (days) | Aberrant anaphases (per- cent) | N° B''s per anaphase | N° B's per anaphase | Reunion index (percent) |
|--|--|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| None (Control) | — | 0 | 0 | 0 | — |
| 370 , 4 h | 6-7 | 50.00 | 4.23 | 0.03 | 13.28 |
| 185 , 24 h | 7-8 | 32.55 | 1.19 | 0.06 | 17.56 |
| 92,5 , 24 h | 5-6 | 45.83 | 1.36 | 0.12 | 8.16 |
| 74 , 24 h | 3-4 | 42.22 | 2.38 | 0 | 16.74 |
| 37 , 24 h | 3-4 | 29.26 | 1.82 | 0.02 | 4.01 |
| 18,5 , 24 h | 2 | 17.77 | 0.50 | 0.01 | 6.62 |
| 9,25, 24 h | 0 | 6.00 | 0,02 | 0 | |

minute illumination in roots pretreated with acridine orange concentrations greater than $1,15 \times 10^{-6}$ M/l (0,31 ppm). Illumination experiments with roots pretreated with a $1,15 \times 10^{-6}$ M/l solution of acridine orange yielded 0,19 B''s per anaphase in presence of pure oxygen and only 0,02 B''s per anaphase in air (no effect in the controls: illumination alone and acridine orange alone). Breaks in isolated cells were also obtained in illumination experiments (100% oxygen in the gas phase) performed on roots pretreated with 0,16 ppm of acridine orange.

It can be concluded that a photodynamic effect of acridine orange on the onion root was demonstrated by our experiments. However, contrary to the behaviour of the broad bean root, the onion root responds easily to the chromosome-breaking effect of acridine orange in the dark. Whether this differential response rests on the particular chromosomal organization of *Vicia faba* or on other differences between the two species remains an open question. A full account of the present investigation will be published by one of us (V.N.R.) on another occasion.

REFERENCES

- D'AMATO F., 1950. — *Studio statistico dell'attività mutagena dell'acridina e derivati*. Caryologia, **2**: 229-297.
- KIHLMAN B., 1959a. — *Induction of structural chromosome changes by visible light*. Nature, **183**: 976-978.
- , 1959b. — *Studies on the production of chromosomal aberrations by visible light: the effect of cupferron, nitric oxide and wavelength*. Exptl. Cell Res., **17**: 590-593.
- , 1959c. — *The effect of respiratory inhibitors and chelating agents on the frequencies of chromosomal aberrations produced by X-rays in Vicia*. J. Biophysic. and Biochem. Cytol., **5**: 481-490.

RIASSUNTO

Gli AA. dimostrano che l'arancio di acridina è capace di determinare nel test *Allium* modificazioni strutturali cromosomiche in assenza di luce. Nello stesso test citologico soluzioni molto diluite di arancio di acridina inducono rotture cromosomiche in presenza di diretta illuminazione e di ossigeno puro.



**TREDICI ANNI DI ATTIVITÀ DEL
« CENTRO DI STUDIO PER LA CITOGENETICA VEGETALE »
DEL C. N. R. SOTTO LA DIREZIONE DI ALBERTO CHIARUGI**

FERNANDO FABBRI

Istituto di Botanica dell'Università, Firenze

In Redazione: il 5 Maggio 1961

Il 25 febbraio 1960, con la morte di Alberto Chiarugi, si veniva praticamente a chiudere l'attività del « Centro di studio per la citogenetica vegetale » da Lui diretto.

Il Centro aveva iniziato la sua attività esattamente tredici anni prima, nel febbraio del 1947, quando Alberto Chiarugi dirigeva l'Istituto di Botanica di Pisa. Egli riusciva così a realizzare, grazie al Consiglio Nazionale delle Ricerche, quello che era andato meditando fin dal 1945, in quasi due anni di progetti. Infatti, l'idea di indirizzare un certo numero di ricercatori verso lo studio della citofisiologia e della citomorfologia vegetale, era maturata nella Sua mente nei primi di agosto del 1945: il 6 di quel mese, Hiroshima era stata dilaniata dall'esplosione della prima bomba atomica della storia, e Alberto Chiarugi — sto riferendo quanto Egli stesso mi disse pochi mesi prima della Sua morte — era rimasto molto scosso da quell'avvenimento. Il senso di agghiacciante sbigottimento, che pervase in quei giorni ogni uomo consapevole, raggiunse in Lui il massimo grado, poichè Egli aveva presto intuito gli incalcolabili pericoli che le esplosioni nucleari avrebbero potuto rappresentare per il patrimonio ereditario di ogni specie vivente, e in particolar modo di quella umana.

Il Suo animo, così come quello di tutti i più illuminati scienziati del mondo, si era ribellato subito, quasi d'istinto, a quella follia realizzatasi proprio grazie all'opera degli scienziati stessi.

Da puro idealista della Scienza, aveva sentito che ogni scienziato aveva il dovere di mettere il più possibile in evidenza quello che le scoperte, pur mirabili, della scienza avrebbero ineluttabilmente causato in futuro.

Bisognava con ogni mezzo dimostrare quanto fosse pazzesco l'uso dell'energia atomica per fini bellici, per far in modo che queste meravigliose scoperte e realizzazioni dei fisici moderni fossero indirizzate verso scopi pacifici, sì da contribuire veramente al cammino evolutivo della civiltà.

Egli aveva intuito che, fra gli scienziati, specialmente i genetisti avevano molto da fare e da dire con lo studio sempre più approfondito degli effetti delle radiazioni sulla cellula vivente. Aveva sentito che anche gli italiani, pur nelle

condizioni di estremo decadimento del dopoguerra, avevano il dovere preciso di far udire la loro modesta parola.

Fu così che nei primi giorni di agosto del 1945 il Chiarugi, botanico e genetista, si ripromise d'iniziare, coadiuvato dal maggior numero possibile di giovani scienziati, un ciclo di ricerche citogenetiche sull'azione delle radiazioni sulla cellula vegetale.

Con questo primo obiettivo nacque quindi nel pensiero del Chiarugi l'idea di creare un centro di studi dedicati alla citogenetica vegetale. Poi, come sempre avviene, l'idea iniziale, prendendo corpo, andò via via modificandosi e ridimensionandosi. Nel 1947 infatti, quando finalmente il Centro per la citogenetica vegetale nacque, Egli partiva con propositi di lavoro ben più vasti, come dimostrano gli argomenti affrontati dalle 257 ricerche pubblicate in tredici anni di attività.

Tuttavia, quanta importanza abbiano avuto nel pensiero di Alberto Chiarugi i tristi avvenimenti di Hiroshima, lo dimostra l'entusiasmo col quale Egli sollecitò e sostenne per tutti quei tredici anni le ricerche di chemiogenetica, la giovane branca della genetica sperimentale che l'Auerbach e l'Oehlkers, indipendentemente l'una dall'altro, avevano iniziato con le loro ricerche del 1943, delle quali appunto in quegli anni, finita la parentesi bellica, il mondo scientifico veniva a conoscenza.

Le ricerche chemiogenetiche — come il Chiarugi stesso ebbe a dirmi — essendo tecnicamente molto più semplici risultavano più facilmente attuabili in quei difficilissimi anni dell'immediato dopoguerra, di quello che non fossero le ricerche radiogenetiche; d'altra parte dimostravano di poter portare anch'esse contributi notevoli allo studio degli intimi meccanismi della mutazione del patrimonio ereditario.

Questa premessa mi è sembrata giustificata, giacchè sono convinto che quanto mi disse Alberto Chiarugi sulle esigenze spirituali che lo spinsero ad organizzare il « Centro di studio per la citogenetica vegetale », sia significativo quale testimonianza dell'entusiastico fervore costruttivo che, subito dopo la guerra, permeò gli ambienti scientifici italiani, e altresì quale prova di quanto tempestiva e saggia sia stata l'opera del Consiglio Nazionale delle Ricerche, che, in quei duri anni, permise agli scienziati più dinamici di concretare gran parte dei loro progetti di ricerca, tesi ad una rinascita scientifica del nostro Paese.

Il « Centro di studio per la citogenetica vegetale » ebbe la sua prima approvazione e iniziò la sua attività, presso l'Istituto di Botanica dell'Università di Pisa, nel febbraio 1947; fu definitivamente istituito col luglio dello stesso anno (CHIARUGI 1950).

Col 1° luglio del 1951, in seguito all'avvenuto trasferimento del suo Direttore, Prof. Alberto Chiarugi, da Pisa a Firenze, il Centro fu trasferito presso l'Istituto

di Botanica dell'Università fiorentina (CHIARUGI 1953, 1957), ove è rimasto fino al 1960, anno in cui è venuto ad essere automaticamente soppresso per la morte del suo Direttore.

In questi tredici anni il Centro non fu un feudo esclusivo degli Istituti Botanici di Pisa e Firenze, ma anzi favorì, offrendo mezzi ed insegnando i metodi di studio, moltissimi ricercatori di altre Università ed Istituti di Ricerca, dimostrando in tal modo quanto il Chiarugi — che pure, per natura e educazione, era un classico rappresentante dell'ottocentesco ricercatore solitario — fosse sensibile alla necessità di tendere ad una collaborazione più larga possibile tra i vari scienziati, anche di scuole le più diverse, favorendo quell'osmosi di idee, indispensabile per la moderna ricerca scientifica.

Penso che il miglior modo di documentare l'attività svolta dal « Centro di studio per la citogenetica vegetale » durante i suoi tredici anni di vita, sia quello di riportare, senza nessun commento ⁽¹⁾, l'elenco completo delle sue 257 pubblicazioni; anche per meglio porre in evidenza i diversi campi di ricerca affrontati dal Centro, ho ritenuto opportuno dividere i vari lavori a seconda dell'argomento trattato.

A. RICERCHE SULL'AGGLUTINAZIONE CROMOSOMICA, SUL CONTROLLO SPERIMENTALE DELLA MITOSI PER MEZZO DI AGENTI CHIMICI E SULL'AZIONE CITOLOGICA DI SOSTANZE MUTAGENE (CHEMIOGENETICA).

(Vedere anche in C: Pubblicazioni n. 43 e 71; in E: 41, 64, 80, 82, 107, 113 e 201; in I: 88, 90, 98, 124, 125, 146, 147, 148, 162, 165 e 170)

24. D'AMATO FRANCESCO ⁽²⁾ — Agglutinazione cromatica (« stickiness ») in *Allium Cepa* L. e altre Liliaceae. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 3: 135-140, 1947).
26. D'AMATO FRANCESCO — Studi sull'agglutinazione cromosomica (« stickiness ») in *Allium Cepa* e altre Monocotiledoni. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 316-353, Tavv. I-III e 2 figg., 1947).
30. D'AMATO FRANCESCO — Contributo al problema dell'agglutinazione cromosomica (« stickiness ») spontanea. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 4: 94-98, 1948).
31. BATTAGLIA EMILIO — Osservazioni sull'azione mutagenica dell'azotoyprite. (La Ricerca Scientifica, Anno 17°, Suppl. a cura del Comit. Naz. per l'Agric., 135-139, 1947).
32. D'AMATO FRANCESCO — Sull'attività colchicino-mitotica e su altri effetti citologici del 2,4-diclorofenossiacetato di sodio. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 4: 570-578, 1948).
34. BATTAGLIA EMILIO — Sull'azione mutagenica dell'azoto-iprite (Ny). (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 4: 771-776, 1948).

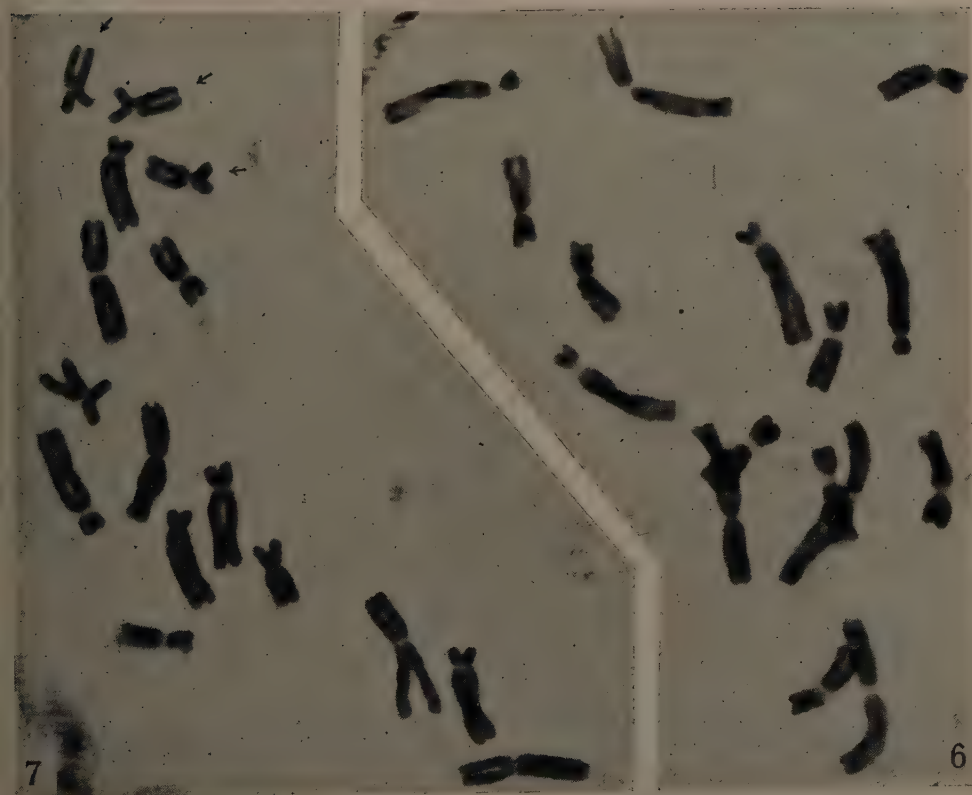
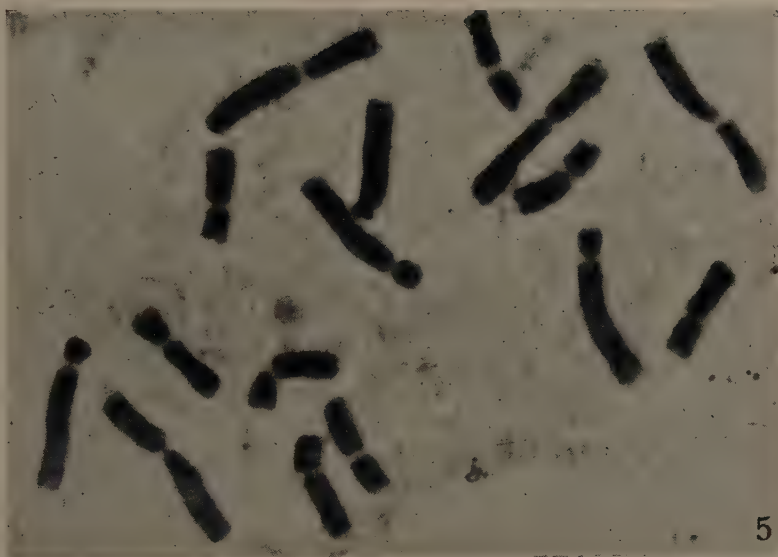
(1) Riassunti commentati delle Pubblicazioni stampate dal 1947 al 1957 (cioè fino alla Pubbl. n. 235) possono essere reperiti, insieme ad altre interessanti notizie sulla vita del Centro, nelle tre note del CHIARUGI pubblicate su « La Ricerca Scientifica » nel 1950, 1953 e 1957.

(2) Il numero che precede il nome dell'Autore è quello che fu assegnato alla pubblicazione dal Direttore del Centro, al momento dell'invio alla stampa.

37. D'AMATO FRANCESCO — Ricerche sull'attività citologica di alcuni composti organici con particolare riguardo alla colchicina-mitosi e agli effetti tossici. (*Caryologia*, 1: 49-78, 1948).
44. D'AMATO FRANCESCO — Sull'attività mutagena dell'acenaftene. (*Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, n. s., 55: 323-324, 1948).
45. D'AMATO FRANCESCO — Prime osservazioni sulla inibizione pre-profasica della cariocinesi nei meristemi radicali. (*Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII*, 5: 460-465, 1948).
46. D'AMATO FRANCESCO — Pre-prophase inhibition of mitosis in root meristems. (*Caryologia*, 1: 109-121, 1949).
49. D'AMATO FRANCESCO e AVANZI MARIA GRAZIA — Studio comparato sull'attività citologica di alcune essenze. (*Caryologia*, 1: 175-193, 1949).
51. D'AMATO FRANCESCO — Sull'attività mutagena e sul tipo di mutazioni cromosomiche indotte dall'acenaftene. (*Caryologia*, 1: 201-208, Tav. V, 1949).
52. D'AMATO FRANCESCO — Sull'impiego del gammesano come agente poliploidizzante. (*Caryologia*, 1: 209-222, 1949).
53. D'AMATO FRANCESCO — Early influence of M-inositol and sugars on gammexane induced C-mitosis. (*Caryologia*, 1: 223-228, 1949).
54. BATTAGLIA EMILIO — Sull'azione citologica dell'etil-carbamato (uretano) e del cicloesil-carbamato. (*Caryologia*, 1: 229-247, Tav. VI e 1 fig., 1949).
55. BATTAGLIA EMILIO — Agglutinazione cromosomica (« stickiness ») quale causa di eccezionali condizioni nucleari nelle cellule del tappeto di *Crepis Zacintha* (L.) Babc. (*Caryologia*, 1: 248-268, 81 figg., 1949).
57. D'AMATO FRANCESCO — Prophase poisoning by chemical agents. (*Caryologia*, 1: 327-328, 1949).
59. D'AMATO FRANCESCO — The effect of m-inositol on C-mitosis and C-tumor reaction. (*Caryologia*, 1: 358-361, 1 fig., 1949).
62. D'AMATO FRANCESCO — Attività citologica del dimercaptopropanolo (BAL) e del metilarzinato di sodio (Arrhenal) e loro azioni combinate. (*Caryologia*, 2: 13-22, 1949).
69. D'AMATO FRANCESCO — Agglutinazione cromosomica (« stickiness ») quale effetto citologico caratteristico di due composti cromici. (*Caryologia*, 2: 191-110, Tav. VI, 1949).
72. LOPANE FAUSTA — Studio quantitativo dell'attività citologica di alcuni composti organici. (*Caryologia*, 2: 143-159, 1950).
76. BATTAGLIA EMILIO — Osservazioni sull'azione citologica di alcune sostanze coloranti. (*Caryologia*, 2: 223-228, 1950).
77. D'AMATO FRANCESCO — Studio statistico dell'attività mutagena dell'Acridina e derivati. (*Caryologia*, 2: 229-297, Tavv. IX-XIII, 4 tabelle, 2 figure e 9 grafici, 1950).
79. BATTAGLIA EMILIO — Effetti citologici del desossiribonucleinato sodico, dell'acido ribonucleinico e del ribonucleinato sodico. (*Caryologia*, 2: 325-338, 3 figg., 1950).
81. D'AMATO FRANCESCO — Notes on the chromosome breaks induced by pure gammexane. (*Caryologia*, 2: 361-364, 4 figg., 1950).
89. BATTAGLIA EMILIO — Nuove sostanze inducenti frammentazione cromosomica. (Simposio internazionale su « le Sostanze mutagene », maggio 1949. Pubbl. Stazione Zoologica di Napoli, 22 (Suppl.): 125-157, 6 tavv., 1950).

Tavola I. - *Contributi ad una revisione cariologica e citosistemica della Flora Italiana* - Piastre metafasiche di cellule di apici radicali della « *Bellevalia Webbiana* » Parl. ($2n = 16$).

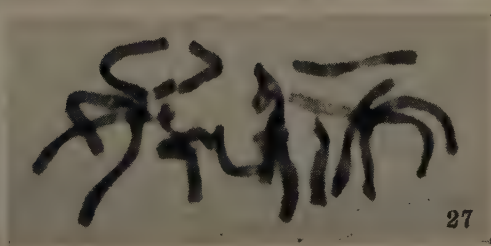
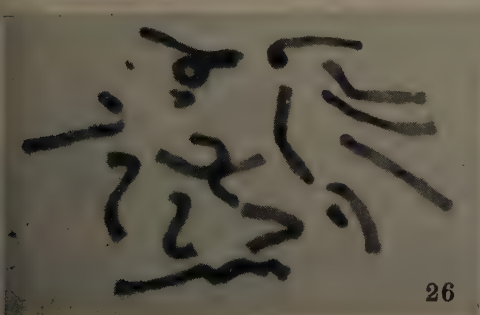
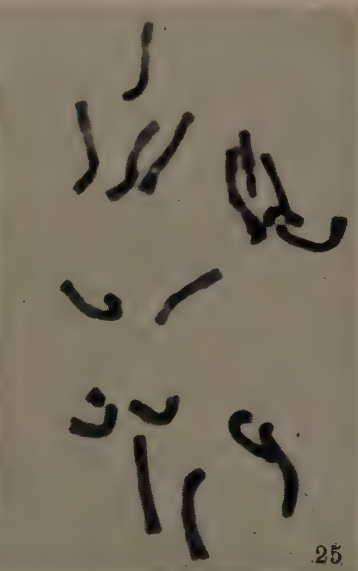
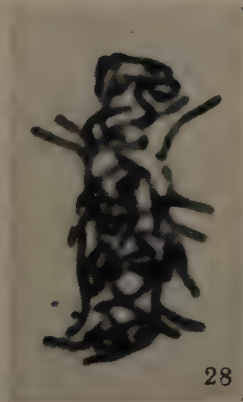
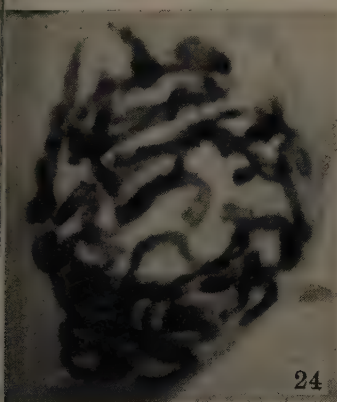
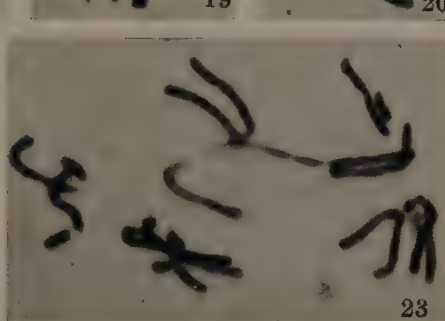
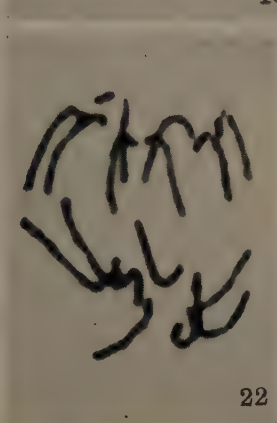
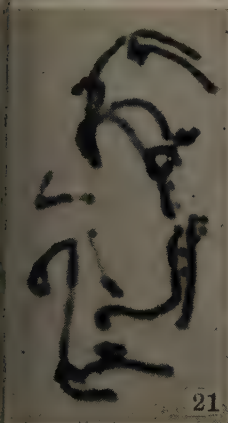
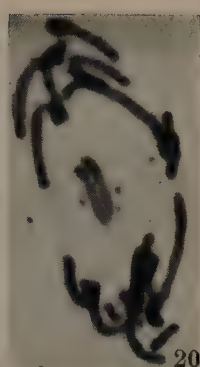
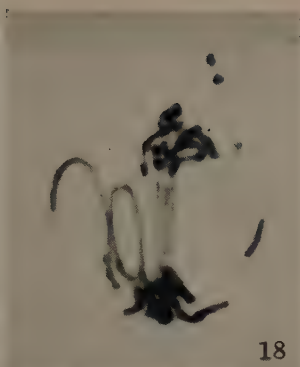
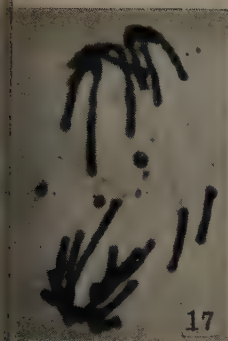
(Da ALBERTO CHIARUGI, Pubblicaz. n. 60, 1949).



93. AVANZI MARIA GRAZIA — Frequenza e tipi di aberrazioni cromosomiche indotte da alcuni derivati dell' α -naftalene. (Caryologia, 3: 163-180, 14 figg., 1950).
95. D'AMATO FRANCESCO — Mutazioni clorofilliane nell'orzo indotte da derivati acridinici. (Caryologia, 3: 211-220, 1950).
97. AVANZI MARIA GRAZIA — Osservazioni sull'attività citologica di alcuni composti chimici. (Caryologia, 3: 234-248, 1 fig., 1950).
99. CHIARUGI ALBERTO — Un Italiano fin dal 1889 osservò l'azione della colchicina sulla mitosi. (Caryologia, 3: 260-262, 1950).
101. D'AMATO FRANCESCO — Mutazioni cromosomiche spontanee in plantule di *Pisum sativum* L. (Caryologia, 3: 285-293, 1951).
103. D'AMATO FRANCESCO — Chromosome breakage by Brilliant Cresil Blue. (Caryologia, 3: 299-304, 6 figg., 1951).
104. D'AMATO FRANCESCO — Nuovi dati sull'attività mutagena dei derivati dell'Acridina. (Caryologia, 3: 311-326, 3 figg., 1951).
108. TARABUSI TERESA — Rotture cromosomiche indotte dagli α -alogeno derivati del naftalene e dalla β -naftochinolina. (Caryologia, 3: 370-380, 7 figg., 1951).
114. GORI CHIARA — Studio citologico dell'effetto mutageno dell'« essenza di Reseda ». (Caryologia, 4: 275-279, 3 figg., 1952).
119. D'AMATO FRANCESCO — Rapporti fra costituzione chimica e attività mutagena nelle Acridine. Dati riassuntivi. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 12: 612-617, 1952).
120. D'AMATO FRANCESCO — Further investigations on the mutagenic activity of acridines. (XXXIII-LI). (Caryologia, 4: 388-413, Plate XXVII and 2 figs., 1952).
121. D'AMATO FRANCESCO — Sulle possibilità di impiego del gammesano per la produzione di poliploidi nei vegetali. (Atti del Convegno di Genetica Agraria in Rieti, 1950, pp. 427-431, Pavia, Tip. del Libro, 1951).
122. D'AMATO FRANCESCO — Does meso-inositol inhibit the Colchicine effect in the roots of *Allium Cepa*? (Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie, 89: 409-414, Gand 1952).
136. D'AMATO FRANCESCO — Sulla presenza di sostanze ad azione antimitotica nel seme di *Pisum sativum* L. (Caryologia, 5: 217-222, 1953).
143. GORI CHIARA — Attività citologica di estratti acquosi di semi di *Reseda odorata* L. e di *Vicia Faba* L. (Caryologia, 5: 371-377, Tav. XXV, 1953).
144. MELETTI PAOLO — Reazioni citologiche indotte in *Allium Cepa* L. da alcuni composti della serie salicilica. (Caryologia, 5: 342-358, 1953).
149. D'AMATO FRANCESCO et AVANZI SILVANA — Nouvelles recherches sur l'action mutagène des Acridines sur l'*Allium Cepa*. (Actes du VIII Congrès International de Botanique, Paris, Rapport et Communications, Sect. 9: 10-11, 1954).
152. D'AMATO FRANCESCO — A survey of acridines for chromosome-breaking (mutagenic) action in *Allium*. (Atti del IX Congresso Internazionale di Genetica, Bellagio, Italia, 24-31 agosto 1953, in « Caryologia », suppl. al 6: 831-835, 1954).
156. D'AMATO FRANCESCO e AVANZI SILVANA — Quarto contributo alla conoscenza dell'attività mutagena dei derivati dell'acridina. (LII-LVIII). (Caryologia, 6: 77-89, Tav. IV e 1 fig., 1954).

Tavola II. - Contributi allo studio dell'azione citogenetica delle radiazioni sulle cellule vegetali - Quadro degli effetti indotti dai raggi X sulle cellule degli apici radicali di « Scilla obtusifolia » Poir.

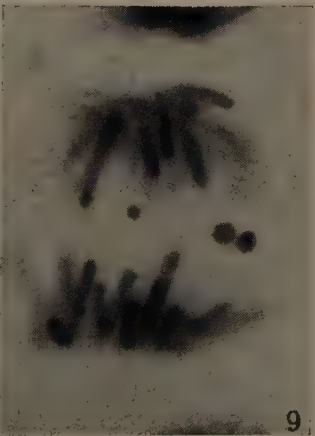
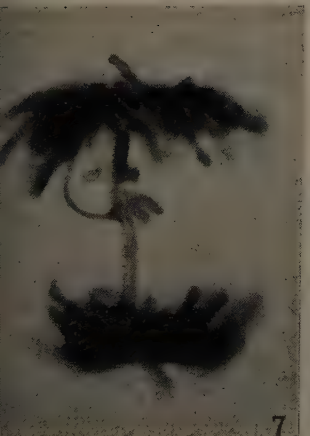
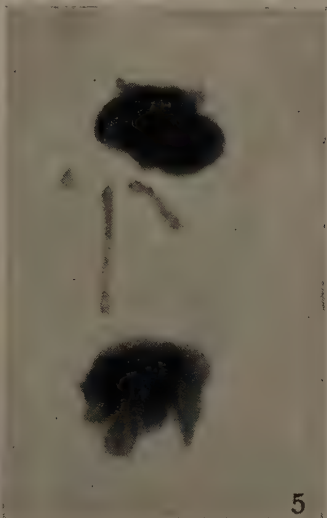
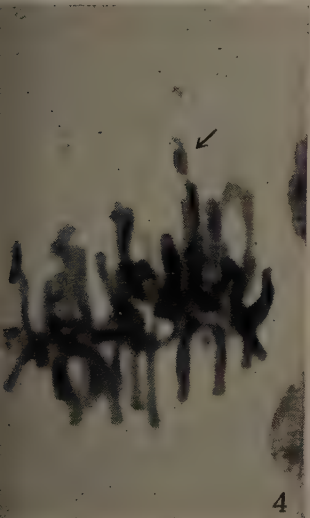
(Da GIUSEPPE MARTINOLI, Pubblicaz. n. 127, 1952).



157. QUERCIOLO ELDA — Sull'azione citologica di Cumarine sostituite in rapporto alla loro struttura chimica. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 16: 645-649, 1954).
158. AVANZI SILVANA — Osservazioni sulla attività citologica della 8-aminochinolina e dei due derivati naftolici. (Caryologia, 6: 128-133, 1954).
159. D'AMATO FRANCESCO and D'AMATO AVANZI MARIA GRAZIA — The chromosome breaking effect of coumarin derivatives in the *Allium* test. (Caryologia, 6: 134-150, Plate VI, 1 fig. and 3 tables, 1954).
160. D'AMATO FRANCESCO — Osservazioni cito-istologiche sulla attività antimitotica e rizogena della cumarina e di cinque suoi derivati. (Caryologia, 6: 160-179, 1954).
164. D'AMATO FRANCESCO — Di alcuni aspetti fisiologici e genetici dell'invecchiamento dei semi. Contributo al problema della senescenza e della mutabilità spontanea nei vegetali. (Caryologia, 6: 217-240, 1954).
171. SCARASCIA GIAN TOMMASO e SCARASCIA VENEZIAN MARIA ELISA — Effetti citologici e caratteristiche biochimiche degli estratti acquosi di una serie di semi di *Soja hispida* M. di diversa età. (Caryologia, 6: 247-270, Tavv. XIII-XIV e 1 fig., 1954).
172. QUERCIOLO ELDA — Struttura molecolare e azione citogenetica e citofisiologica di sostanze del gruppo delle cumarine. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 18: 313-318, 1955).
173. CORTINI CARMELA — Azione citogenetica delle sostanze del gruppo delle podofilline. (Caryologia, 7: 72-86, Tavv. I-IV, 1955).
174. BURRONI MARIANCILLA — L'azione citogenetica degli alcaloidi del gruppo della veratrina. (Caryologia, 7: 87-97, Tavv. V-VI, 1955).
178. ROSSI ANNA — L'azione citogenetica del solfato di Berberina. (Caryologia, 7: 179-190, Tavv. XII-XIII e 4 figg., 1955).
180. ROSSI ANNA — L'azione citogenetica dell'idrazide maleica sugli apici radicali di *Allium Cepa* L. (Caryologia, 7: 205-218, Tavv. XV-XVI e 6 figg., 1955).
182. QUERCIOLO ELDA — L'azione citofisiologica e citogenetica delle sostanze del gruppo delle cumarine in rapporto alla loro costituzione molecolare. (Caryologia, 7: 350-387, Tavv. XXIII-XXVIII e 2 figg., 1955).
183. GORI CHIARA e MAUGINI ELENA — Effetti citologici e rizogeni di alcune sostanze di crescita. (Caryologia, 7: 404-414, Tav. XXIX e 1 fig., 1955).
185. MELETTI PAOLO — Azione mitostatica dell'acido salicilico sui tessuti della radice di *Allium Cepa* L. stimolati alla mitosi. Studio cito-istologico sperimentale. (Caryologia, 8: 33-44, 1955).
193. MELETTI PAOLO — Reazioni citologiche indotte, in *Allium Cepa* L., da alcune soluzioni tampone. (Caryologia, 8: 231-239, 1955).
202. AVANZI SILVANA — « Non congressione », « non disgiunzione » ed altre aberrazioni mitotiche indotte dall'acetato di tallio in *Allium Cepa*. (Caryologia, 9: 131-148, Tavv. XII-XIV, 1956).
204. CORTINI CARMELA — Azione citogenetica di alcuni derivati della Colchicina. (Caryologia, 9: 1-18, Tavv. I-V, 1956).
206. QUERCIOLO ELDA — Nuovi studi sul rapporto fra la costituzione molecolare e l'azione delle cumarine sulla cellula vegetale. (Caryologia, 9: 177-214, Tavv. XV-XVIII e 2 figg., 1957).

Tavola III. - Contributi allo studio dell'azione citogenetica di alcune sostanze organiche sulle cellule meristematiche degli apici radicali del test « *Allium cepa* » - Qualche aspetto degli effetti indotti dall'Acenafte.

(Da FRANCESCO D'AMATO, Pubblicaz. n. 51, 1949).



212. AGOSTINI SERENA — L'azione citogenetica di un gruppo di derivati naftalenici. (Caryologia, 9: 377-407, Tavv. XXVII-XXX e 3 figg., 1957).
221. GORI CHIARA e ZUCCONI LAURA — L'azione citologica indotta da un gruppo di composti inorganici su *Allium Cepa*. (Caryologia, 10: 29-45, Tavv. IV-VI, 1957).
228. MELETTI PAOLO — Azioni citologiche di elettroliti e non-elettroliti sulla cellula vegetale con particolare riguardo agli effetti di soluzioni ipertoniche. (Caryologia, 10: 161-180, 1957).
229. AVANZI SILVANA — Inibizione dell'effetto citologico dell'acetato di Tallio per mezzo della cisteina. (Caryologia, 10: 96-101, 1957).
240. GORI CHIARA — Osservazioni preliminari sull'azione citologica di alcune furocumarine e dell'essenza di Bergamotto. (Caryologia, 11: 68-71, 3 figg., 1958).
254. MILOSSKY ALESSANDRA — Ricerche sull'azione citogenetica delle sostanze chinoliniche. (Caryologia, 12: 439-481, Tavv. XXXI-XL e 2 figg., 1960).

B. RICERCHE SUGLI EFFETTI CITOGENETICI DELLE RADIAZIONI (RADIOGENETICA).

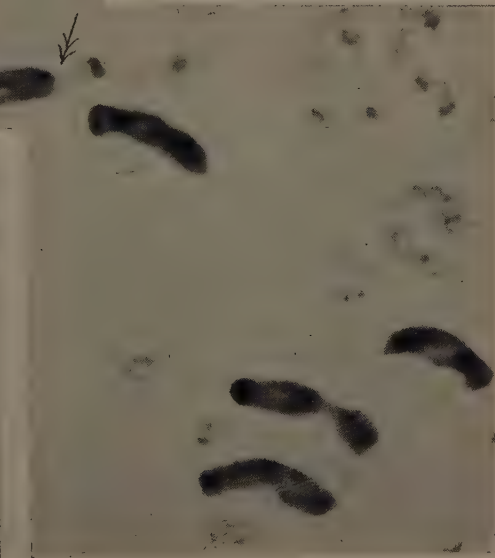
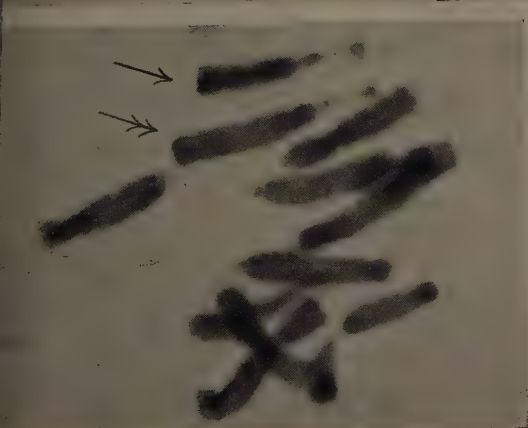
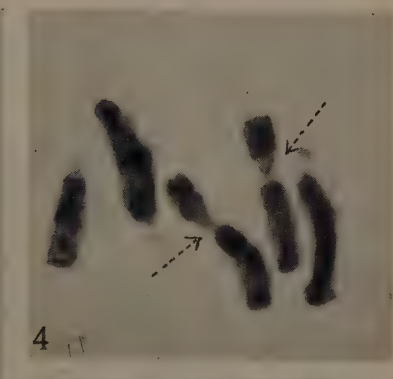
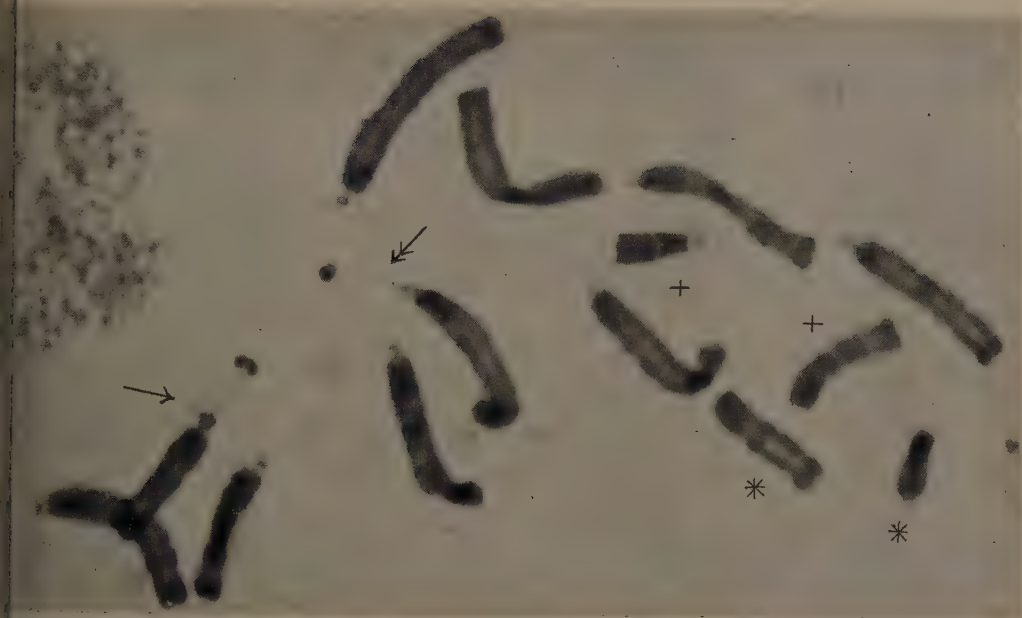
127. MARTINOLI GIUSEPPE — Effetti citologici indotti da raggi X su meristemi apicali di *Scilla obtusifolia* Poir. (Caryologia, 5: 52-85, Tavv. IV-VI e 2 figg., 1952).
153. MARTINOLI GIUSEPPE — Effetti citologici indotti da raggi ultravioletti su meristemi apicali di *Scilla obtusifolia* Poir. (Atti del IX Congresso Internazionale di Genetica, Bellagio, Italia, 24-31 agosto 1953, in « Caryologia », suppl. al 6: 1100, 1954).
163. MARTINOLI GIUSEPPE — Mutazioni cariologiche indotte da raggi ultravioletti su cellule apicali di *Scilla obtusifolia* Poir. (Caryologia, 6: 190-216, Tavv. XI-XII e 1 fig., 1954).
222. SCARASCIA GIAN TOMMASO — Ricerche sugli effetti della radiazione in *Nicotiana*. II: Modificazioni morfologiche ed irregolarità meiotiche in piante di *Nicotiana Tabacum* L. derivate da semi trattati con neutroni termici. (Caryologia, 10: 304-329, Tavv. XXX-XXXVII, 1957).
232. MESSERI ENRICO — Osservazioni sulla germinazione, lo sviluppo e la discendenza di *Vicia sativa* L. nata da semi trattati con raggi X. (Caryologia, 10: 209-243, 20 figg., 1957).
238. AVANZI SILVANA — Osservazioni preliminari sugli effetti fisiologici e citogenetici della irradiazione di semi di grano duro « Cappelli » con raggi X e con neutroni termici. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 23: 159-165, 1957).

C. RICERCHE DI CARIOLOGIA SISTEMATICA, GEOGRAFICA E FILOGENETICA.

- (Vedere anche in D: Pubblicazioni n. 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 25, 35, 39, 63, 67, 96, 140, 213, 225 e 242; in F: 257; in I: 150 e 253)
3. D'AMATO FRANCESCO — Sul corredo cromosomico di *Euphorbia pubescens* Vahl. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 52 (1945): 86-87, 2 figg., 1947).
 4. CHIARUGI ALBERTO — Contributo alla citogenetica del genere *Jonopsidium* (Cruciferae). (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 52 (1945): 93-94, 1 fig., 1947).
 9. BATTAGLIA EMILIO — La natura verosimilmente ibrida e poliploide del *Laurus nobilis* L. rivelata dall'analisi citogenetica. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 2: 463-467, 1947).

Tavola IV. - Contributi allo studio approfondito del cariotipo di alcune Angiosperme - Piastre metafasiche e vedute parziali di mitosi di apici radicali di « *Triteleia uniflora* » Lindl.

(Da EMILIO BATTAGLIA, Pubblicaz. n. 130, 1952).



27. D'AMATO FRANCESCO — Fenomeni di auto-incompatibilità nel Corniolo (*Cornus mas* L.)? (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 365-367, 1 fig., 1947).
29. D'AMATO FRANCESCO — Contributo alla migliore conoscenza del kariogramma di *Bellevia romana* Sweet. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 796-799, 2 figg., 1947).
36. D'AMATO FRANCESCO — Autotetraploidia spontanea in *Allium Ceba* L. (Caryologia, 1: 48, 1 fig., 1948).
38. SERMONTI GIUSEPPE — Osservazioni sul kariogramma di *Sisyrinchium striatum*. (Caryologia, 1: 79-82, 2 figg., 1948).
40. MARTINOLI GIUSEPPE — Nota sulla kariologia della *Bellevia sessiliflora* (Viv.) Kth. (Caryologia, 1: 102-106, 5 figg., 1948).
43. D'AMATO FRANCESCO — Mutazioni cromosomiche spontanee in *Nothoscordum fragrans* Kunth. (Caryologia, 1: 107-108, 1948).
47. MARTINOLI GIUSEPPE — Cariologia comparata del *Pancratium maritimum* L. e del *Pancratium illyricum* L. in rapporto alla validità del genere *Halmyna*. (Caryologia, 1: 122-130, 6 figg., 1949).
48. BATTAGLIA EMILIO — Mutazioni cromosomiche in *Scilla peruviana* L. (Caryologia, 1: 144-174, Tavv. I-IV e 19 figg., 1949).
50. D'AMATO FRANCESCO — Risultati di un'analisi cario-embriologica in una popolazione di *Nothoscordum fragrans* Kunth. (Caryologia, 1: 194-200, 2 figg., 1949).
56. BATTAGLIA EMILIO — Diploidia e triploidia in *Sternbergia lutea* Ker.-Gawl. (Caryologia, 1: 269-279, Tav. VII e 6 figg., 1949).
58. MARTINOLI GIUSEPPE — Ricerche citotassonomiche sui generi *Urginea* e *Scilla* della flora sarda. (Caryologia, 1: 329-357, Tav. X e 18 figg., 1949).
60. CHIARUGI ALBERTO — Saggio di una revisione cito-sistemica della Flora Italiana. I: Il tetraploidismo della *Bellevia Webbiana* Parl. e il suo diritto di cittadinanza nella Flora Italiana. (Caryologia, 1: 362-377, Tavv. XI-XII e 4 figg., 1949).
61. D'AMATO FRANCESCO — Biotipi kariologici ed embrionici avventizi in *Nothoscordum fragrans* Kunth. (Caryologia, 1: 378-380, 2 figg., 1949).
65. DOLCHER TULLIO — Sulla kariologia di *Spinacia turkestanica* M. M. Ilij. (Caryologia, 2: 55-59, 12 figg., 1949).
66. D'AMATO FRANCESCO — Studio citologico ed embriologico di *Bowiea volubilis* Harv. (Caryologia, 2: 60-70, Tav. II, 1 grafico e 12 figg., 1949).
68. BATTAGLIA EMILIO — Nuove mutazioni cromosomiche in *Scilla peruviana* L. (Secondo contributo). (Caryologia, 2: 85-100, Tavv. III-V e 8 figg., 1949).
70. AVANZI MARIA GRAZIA — Il numero cromosomico di specie e varietà di *Solanum* oriunde del Chile. (Caryologia, 2: 111-112, 1949).
71. DOLCHER TULLIO — Studio kariologico di alcune specie del genere *Crinum* con osservazioni sull'agglutinazione cromosomica spontanea e fenomeni citologici concomitanti. (Caryologia, 2: 127-142, 25 figg., 1950).
83. MARTINOLI GIUSEPPE — Studio citologico della *Gagea Soleirolii* F. Schultz. (Caryologia, 3: 72-76, 4 figg., 1950).
85. GIUFFRIDA CARMELA — Mutazioni genomiche in *Urginea maritima* Bak. (Caryologia, 3: 113-125, 17 figg., 1950).
87. BATTAGLIA EMILIO — Mutazioni in *Scilla peruviana* L. (Terzo contributo). (Caryologia, 3: 126-147, Tavv. V-VIII e 32 figg., 1950).
92. MARTINOLI GIUSEPPE — Contributo alla kariologia del genere *Ornithogalum*. (Caryologia, 3: 156-164, 6 figg., 1950).
106. LEONCINI MARIA LUISA — Biotipi kariologici e sistematici di *Caltha* in Italia. (Caryologia, 3: 336-350, 7 figg., 1951).

109. LOPANE FAUSTA — Sul numero cromosomico di *Periploca graeca* L. (Asclepiadaceae). (Caryologia, 4: 44-46, 3 figg., 1951).
112. MARTINOLI GIUSEPPE — Studio cariologico sul genere *Ruscus* (Asparagaceae). (Caryologia, 4: 86-97, 6 figg., 1951).
115. MAUGINI ELENA — Ricerche citogenetiche sulle antere di due ibridi di *Pyrus* e dei loro due genitori. (Caryologia, 4: 295-310, Tavv. XVIII-XXV e 7 figg., 1952).
117. ESPOSITO SEU MARCHERITA MARIA e MAUGINI ELENA — Osservazioni sul kariogramma di *Endymion hispanicus* (Mill.) Chouard subsp. *campanulatus* Parl. (Liliaceae). (Caryologia, 4: 359-366, Tav. XXVI e 6 figg., 1952).
118. LEONCINI MARIA LUISA — Nuove osservazioni cariologiche sul genere *Caltha*. (Caryologia, 4: 367-371, 8 figg., 1952).
126. MAUGINI ELENA — Osservazioni cariologiche su *Narcissus italicus* Ker. Gawl. (Amaryllidaceae). (Caryologia, 5: 101-112, 7 figg., 1952).
128. BATTAGLIA EMILIO — Esiste un tipo cromosomico con «centromero nucleolare» in *Nerine undulata* Herb.? (Caryologia, 5: 43-52, Tav. III e 8 figg., 1952).
130. BATTAGLIA EMILIO — Mutazioni cromosomiche in *Triteleia uniflora* Lindl. (Caryologia, 5: 113-122, Tav. X e 2 figg., 1952).
134. MAUGINI ELENA — Ricerche cito-sistematiche su *Scilla Hughii* Tin. (Liliaceae). (Caryologia, 5: 167-177, Tavv. XV-XVII e 6 figg., 1953).
135. MARTINOLI GIUSEPPE — Studio cariologico ed ecologico della *Phyllitis hybrida* C. Christ. (Aspleniaceae). (Caryologia, 5: 178-191, Tav. XVIII e 18 figg., 1953).
137. BATTAGLIA EMILIO — Filogenesi del cariotipo nel genere *Scilla*. I: *Scilla numidica* Poir. (Caryologia, 5: 237-248, Tav. XIX e 6 figg., 1953).
138. MAUGINI ELENA — Nuovi reperti di biotipi diploidi di *Urginea maritima* L. (Caryologia, 5: 249-252, 3 figg., 1953).
139. MARTINOLI GIUSEPPE — Studio citotassonomico dei generi *Hyòseris* e *Robertia* con particolare riferimento all'*Hyòseris taurina* G. Martinoli sp. nov. (Asteraceae). (Caryologia, 5: 253-281, Tavv. XX-XXII e 16 figg., 1953).
141. MAUGINI ELENA — Contributo alla conoscenza cariologica e sistematica del genere *Caltha* in Italia. (Caryologia, 5: 297-305, 6 figg., 1953).
142. MAUGINI ELENA — Citosistematica di alcuni *Narcissus* della Flora Italiana appartenenti alla Sect. *Hermione*. (Caryologia, 5: 313-341, 17 figg., 1953).
154. BILLERI GABRIELLA — Osservazioni sul kariogramma di *Allium moschatum* L. (Liliaceae). (Caryologia, 6: 45-51, Tav. I e 5 figg., 1954).
155. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche citotassonomiche in *Dipcadi fulvum* Webb. (Caryologia, 6: 63-76, 8 figg., 1954).
167. GORI CHIARA — Osservazioni sul kariogramma e sul ciclo nucleolare di *Centaurea Cineraria* L. (Caryologia, 6: 241-246, 4 figg., 1954).
168. BATTAGLIA EMILIO — Assenza di centromero localizzato in *Heleocharis uniglumis* (Link) Schult. (Caryologia, 6: 319-332, Tav. XVII, 1954).
169. BREVIGLIERI NINO e BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche in *Olea europaea* L. (Caryologia, 6: 271-283, Tavv. XV-XVI e 5 figg., 1954).
175. MELETTI PAOLO — Il problema del «Denti de cani» in Sardegna. Contributo alle conoscenze sull'origine di un *Triticum* esaploide. (Caryologia, 7: 98-113, Tav. VII e 6 figg., 1955).
176. MARTINOLI GIUSEPPE — Cariologia di alcune specie del genere *Allium* (Liliaceae) della Sardegna. (Caryologia, 7: 145-156, Tav. VIII e 6 figg., 1955).
177. BATTAGLIA EMILIO — Filogenesi del cariotipo nel genere *Scilla*. IV: *Scilla villosa* Desf. (Caryologia, 7: 157-178, Tavv. IX-XI e 6 figg., 1955).

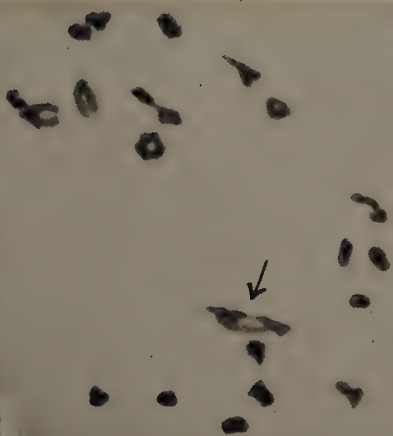
179. MARTINOLI GIUSEPPE — Citotassonomia di alcune specie del genere *Avena* della Sardegna. (Caryologia, 7: 191-204, Tav. XIV e 7 figg., 1955).
181. D'AMATO FRANCESCO — Revisione citosistemica del genere *Colchicum*. I: *C. autumnale* L., *C. lusitanum* Brot. e *C. neapolitanum* Ten. (Caryologia, 7: 292-349, Tavv. XVII-XXII e 3 figg., 1955).
195. CHIARUGI ALBERTO — *Primula Palinuri* Petagna. Posizione sistematica e significato fitogeografico attraverso l'indagine citogenetica. (Webbia, 11: 861-888, 19 figg., 1956).
196. MAUGINI ELENA — Ricerche cito-sistematiche su *Scilla Cupani* Guss. (Liliaceae). (Caryologia, 8: 370-378, Tavv. XXIX-XXX e 4 figg., 1956).
197. BATTAGLIA EMILIO — Filogenesi del cariotipo nel genere *Scilla*. V: *Scilla Lilio Hyacinthus* L. (Caryologia, 9: 19-37, Tav. VI e 8 figg.).
198. D'AMATO FRANCESCO — Attuali conoscenze sulla citotassonomia del genere *Colchicum*. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 20: 632-638, 1956).
200. ZUCCONI LAURA — Osservazioni sul kariogramma di *Lilium carnioolicum* Bernh. (Liliaceae). (Caryologia, 8: 379-388, 6 figg., 1956).
203. MAUGINI ELENA — Contributo alla citogeografia di *Urginea maritima* Bak. (Liliaceae). (Caryologia, 9: 174-176, 1956).
205. D'AMATO AVANZI MARIA GRAZIA — Attuali conoscenze sulla citosistemica del genere *Cassia* (Caesalpiniaceae-Cassieae). (Caryologia, 9: 166-173, 1956).
207. ZUCCONI LAURA — Caryologia del genere *Babiana* (Iridaceae). (Caryologia, 9: 226-233, 11 figg., 1957).
208. MAUGINI ELENA — Ricerche cito-sistematiche sul genere *Caltha* in Italia. (Caryologia, 9: 408-435, Tavv. XXXI-XXXIX e 22 figg., 1957).
209. BATTAGLIA EMILIO — Filogenesi del cariotipo nel genere *Urginea*. I-III: *U. maritima* (L.) Baker, *U. fugax* (Moris) Steinh. ed *U. undulata* (Desf.) Steinh. (Caryologia, 9: 234-273, Tavv. XIX-XXI e 18 figg., 1957).
210. BATTAGLIA EMILIO — *Urginea maritima* (L.) Baker: biotipi 2n, 3n, 4n, 6n, e loro distribuzione geografica. (Caryologia, 9: 293-314, Tavv. XXIII-XXVI ed 1 fig., 1957).
211. D'AMATO FRANCESCO — Revisione citosistemica del genere *Colchicum*. II: Nuove località di *C. autumnale* L., *C. lusitanum* Brot. e *C. neapolitanum* Ten. e delimitazione dell'areale delle tre specie nella penisola italiana. (Caryologia, 9: 315-339, 1 fig., 1957).
214. MORI MARIA — Il numero cromosomico diploide di alcune specie di Angiospermae raccolte nella tenuta di S. Rossore (Pisa). (Caryologia, 9: 365-367, 4 figg., 1957).
218. D'AMATO AVANZI MARIA GRAZIA — Sul numero cromosomico diploide di *Salvinia natans* All. (Caryologia, 9: 373-375, 1 fig., 1957).
219. D'AMATO FRANCESCO — Revisione citosistemica del genere *Colchicum*. III: *C. alpinum* Lam. et DC., *C. Cupanii* Guss., *C. Bivonae* Guss. e chiave analitica per la determinazione delle specie di *Colchicum* della Flora Italiana. (Caryologia, 10: 111-151, Tavv. XVIII-XXII e una cartina, 1957).
220. BATTAGLIA EMILIO — *Allium ascalonicum* L., *A. fistulosum* L., *A. Cepa* L.: analisi cariotipica. (Caryologia, 10: 1-28, Tavv. I-III e 7 figg., 1957).
223. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche citotassonomiche nel genere *Urginea*: *Urginea maritima* (L.) Baker e *Urginea maura* Maire. (Caryologia, 10: 244-274, Tavv. XXVII-XXIX e 5 figg., 1957).

Tavola V. - Contributi allo studio dell'azione citogenetica delle radiazioni sulle cellule vegetali - Alcune irregolarità meiotiche in piante di « *Nicotiana tabacum* » L. derivate da semi trattati con neutroni termici.

(Da GIAN TOMMASO SCARASCIA, Pubblicaz. n. 222, 1957).



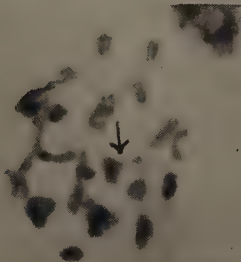
2



4



5



8



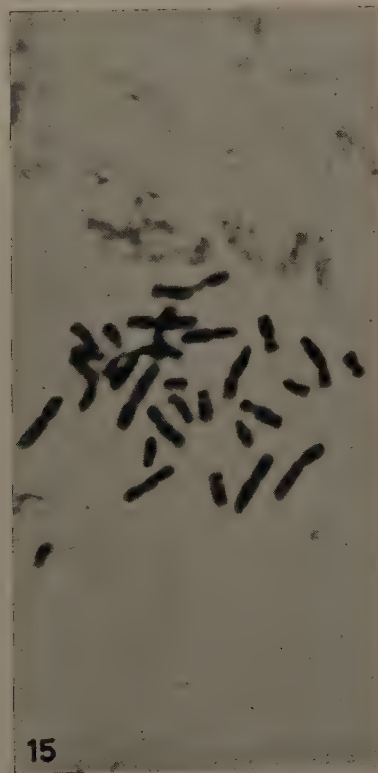
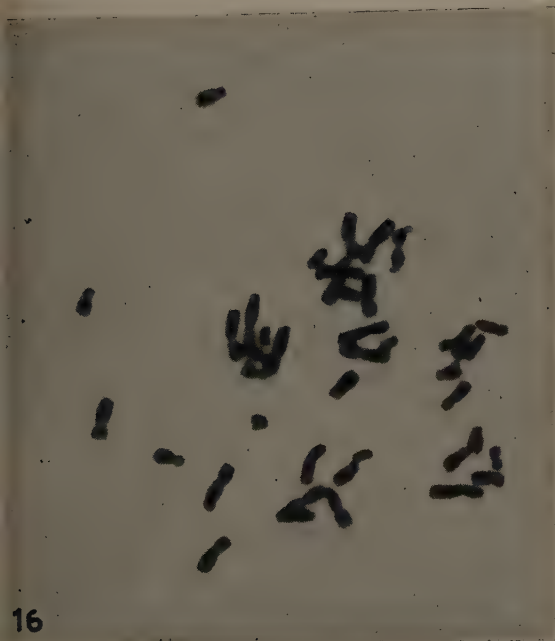
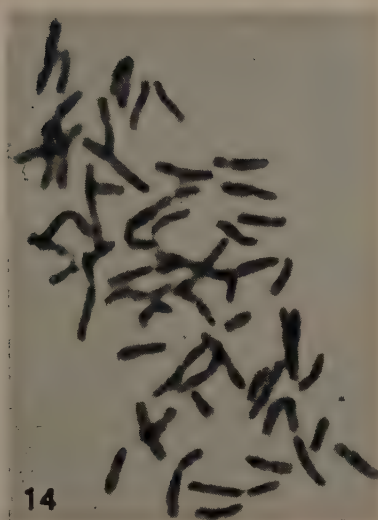
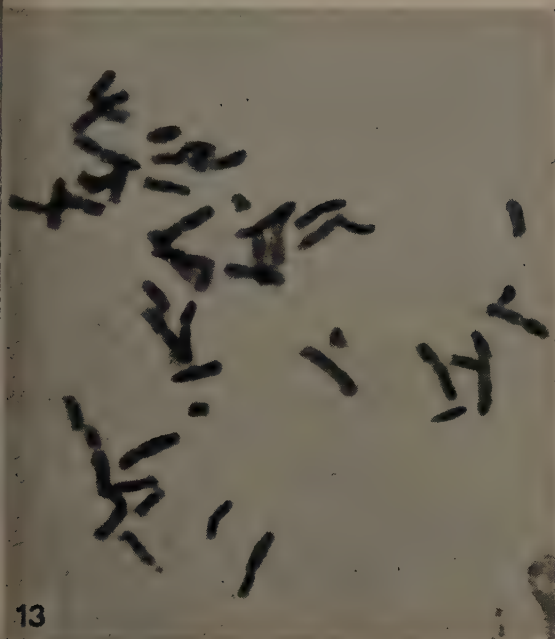
226. BATTAGLIA EMILIO — *Scilla autumnalis* L.: biotipi 2n, 4n, 6n e loro distribuzione geografica. (Caryologia, 10: 75-95, Tavv. XIV-XVI e 11 figg., 1957).
233. FABBRI FERNANDO — Citogenetica della *Notholaena Marantae* (L.) R. Br. (Sinopteridaceae). (Caryologia, 10: 388-390, Tav. XLI e 2 figg., 1957).
234. FABBRI FERNANDO — Sondaggi citogenetici nelle Polypodiaceae *sensu stricto*. (Caryologia, 10: 402-407, Tavv. XLII-XLIV e 6 figg., 1957).
235. FABBRI FERNANDO — L'ottoploidismo di *Adiantum cuneatum* Langsd. et Fisch. (Adiantaceae). (Caryologia, 10: 408-411, Tav. XLV e 3 figg., 1957).
237. GORI CHIARA — Sul kariogramma della *Fritillaria messanensis* Raf. (Caryologia, 11: 28-33, Tavv. I-II e 3 figg., 1958).
239. GORI CHIARA — Il numero dei cromosomi dell'*Arum nigrum* Schott var. *apulum* Carano. (Caryologia, 10: 454-456, Tav. XLVI e 1 fig., 1958).
241. BATTAGLIA EMILIO — Filogenesi del cariotipo nel genere *Urginea*. IV: *U. aurantiaca* Lindberg [= *U. noctiflora* Batt. et Trab. var. *aurantiaca* (Lindberg) Maire]. (Caryologia, 11: 79-96, Tavv. IV-V e 7 figg., 1958).
244. BATTAGLIA EMILIO — Il cariotipo di *Scilla hyacinthoides* L. (Liliaceae). (Caryologia, 11: 261-272, Tavv. XX-XXI e 6 figg., 1959).
247. BATTAGLIA EMILIO — Mutazioni cromosomiche e formule relative. (Caryologia, 11: 259-260, 1958).
250. BATTAGLIA EMILIO e CENNI BRUNO — Contributo alla cariologia di *Bos taurus*. (Caryologia, 12: 162-172, Tavv. XII-XIV, 1959).
251. BOZZINI ALESSANDRO — Revisione cito-sistemica del genere *Asparagus* L. I: Le specie di *Asparagus* della flora italiana e chiave analitica per la loro determinazione. (Caryologia, 12: 199-264, Tavv. XV-XVII, 1959).
255. CHIARUGI ALBERTO — Tavole cromosomiche delle Pteridophyta. (Caryologia, 13: 27-150, 1960).
256. MAUGINI ELENA — Ricerche sulla citogeografia e sulla tassonomia dell'*Urginea maritima* Bak. (Caryologia, 13: 151-163, 1 fig., 1960).

D. RICERCHE SULLA MEIOSI E SULLA GAMETOGENESI DELLE ANGIOSPERME ANFIMITICHE E APOMITTICHE.

(Vedere anche in C: Pubblicazioni n. 50 e 66)

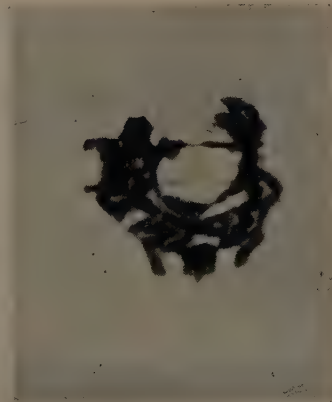
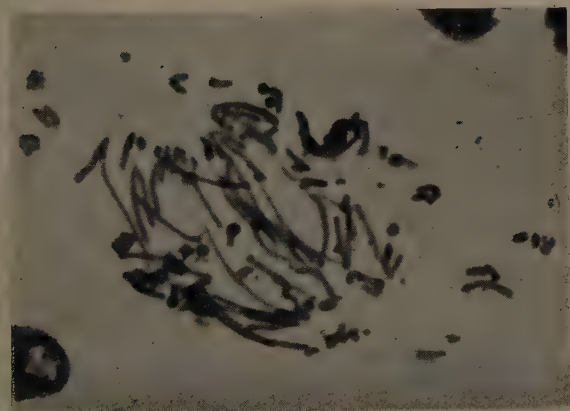
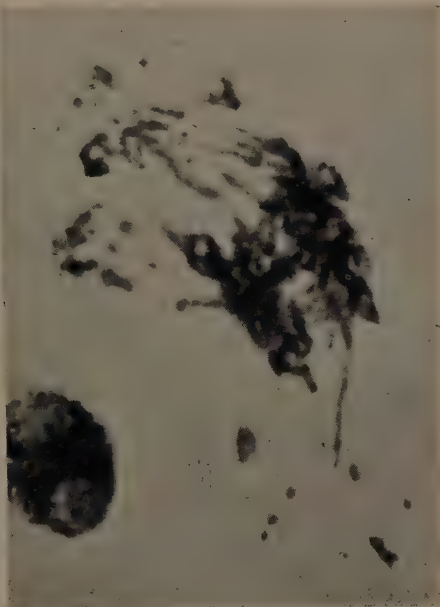
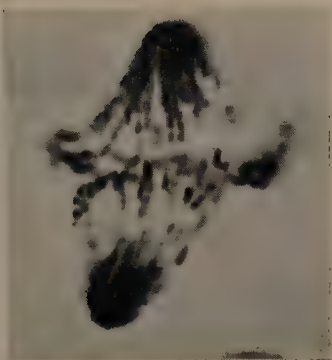
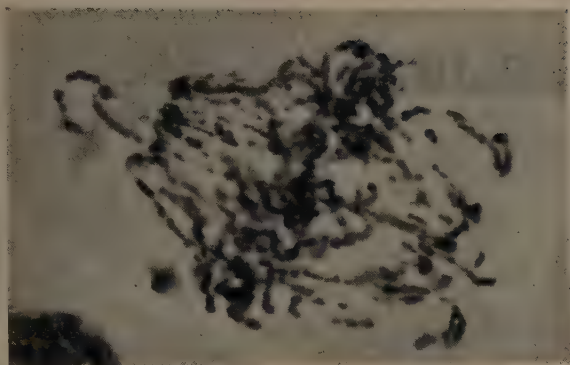
1. BATTAGLIA EMILIO — Fenomeni citologici nuovi nella embriogenesi (« semigamia ») e nella microsporogenesi (« doppio nucleo di restituzione ») di *Rudbeckia laciniata* L. Nota preventiva. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 52 (1945): 34-38, 1947).
5. BATTAGLIA EMILIO — La « Semigamia », singolare comportamento del nucleo spermatico delle uova diploidi delle specie apomittiche del genere *Rudbeckia* (Asteraceae) e conseguente embriogenesi di tipo chimero. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze Fis., Ser. VIII, 2: 63-67, 2 tavv., 1947).
6. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche kariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). I-V: Il gametofito femminile e maschile di *R. bicolor* Nutt., *R. hirta* L.,

Tavola VI. - *Contributi ad una revisione kariologica e citosistemica della Flora Italiana* - Piastre metafasiche di alcuni biotipi cromosomici di due specie del genere « *Caltha* »: « *C. laeta* » Sch. N. Ky. con $2n = 52$ (Fig. 13) e $2n = 58$ (Fig. 14), e « *C. cornuta* » Sch. N. Ky. con $2n = 30$ (Fig. 15) e $2n = 43$ (Fig. 16).
(Da ELENA MAUGINI, Pubblicaz. n. 208, 1957).



- R. hirta* L. var. *meine freude* Hort., *R. amplexicaulis* Vahl e *R. purpurea* L. (= *Echinacea purpurea* Moench). (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 1-26, Tavv. I-IV, 1947).
7. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). VI: Apomissia in *Rudbeckia speciosa* Wender. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 27-69, Tavv. V-XII e 5 figg., 1947).
 8. D'AMATO FRANCESCO — Osservazioni cito-embriologiche su *Cornus mas* L. con particolare riguardo alla sterilità di un biotipo triploide. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 170-210, 177 figg., 1947).
 10. BATTAGLIA EMILIO — Considerazioni su una memoria della Prof. Valeria Bambacioni Mezzetti: « Un nuovo caso di formazione di diadi nella microsporogenesi del *Laurus nobilis* L. (1938) ». (Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Memorie, 54: 42-49, 1947).
 11. BATTAGLIA EMILIO — Meiosi anormale nella microsporogenesi di *Laurus nobilis* L. (Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Memorie, 54: 50-69, 38 figg., 1947).
 12. BATTAGLIA EMILIO — Apomissia in *Hieracium ramosum* Waldst., et Kit. (Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Memorie, 54: 70-78, 20 figg., 1947).
 13. D'AMATO FRANCESCO — Nuove ricerche embriologiche e cariologiche sul genere *Euphorbia*. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 405-436, 124 figg., 1947).
 14. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). VII: Apomissia in *Rudbeckia laciniata* L. e amfimissia nella sua varietà a fiori doppi. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 437-482, 105 figg., 1947).
 15. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). VIII: Semigamia in *Rudbeckia laciniata* L. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 483-511, 39 figg., 1947).
 17. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). IX: Le anomalie del gametofito femminile cellularizzato di *Rudbeckia laciniata* L. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 377-405, 61 figg., 1947).
 18. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). X: Le anomalie della meiosi durante la microsporogenesi di *Rudbeckia laciniata* L. con particolare riguardo alla formazione del nucleo di restituzione. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 406-431, 56 figg., 1947).
 19. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). XI: Semigamia in *Rudbeckia speciosa* Wender. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 531-559, 77 figg., 1947).
 20. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sul genere *Rudbeckia* (Asteraceae). XII: Il gametofito femminile e maschile di *Rudbeckia flava* Greene, con particolare riguardo al suo comportamento di ibrido strutturale. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 560-567, 27 figg., 1947).
 25. DESÒLE LUIGI — Fenomeni di aposporia accompagnanti lo sviluppo del gametofito femminile di *Petasites fragrans* Presl. (Asteraceae). (Atti Soc. Tosc. Sci. Nat., Memorie, 55: 24-38, 22 figg., 1947).
 35. BATTAGLIA EMILIO — Ricerche sulla parameiosi restituzionale nel genere *Taraxacum*. (Caryologia, 1: 1-47, 106 figg., 1948).
 39. AVANZI MARIA GRAZIA — Osservazioni cito-embriologiche su *Ammobium alatum* R. Br. (Asteraceae). (Caryologia, 1: 83-91, 42 figg., 1948).

Tavola VII. - Contributi allo studio dell'azione citogenetica di alcune sostanze organiche sulle cellule meristematiche degli apici radicali del test « *Allium cepa* » - Qualche aspetto degli effetti indotti da alcuni derivati della Cumarina.
(Da ELDA QUERCIOLO, Pubblicaz. n. 182, 1955).



42. MARTINOLI GIUSEPPE — Embriologia della *Peperomia maculosa* Hook. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 55: 235-250, 27 figg., 1948).
63. BATTAGLIA EMILIO — L'alterazione della meiosi nella riproduzione apomittica di *Chondrilla juncea* L. (Caryologia, 2: 23-30, 23 figg., 1949).
67. D'AMATO FRANCESCO — Triploidia e apomissia in *Statice oleaefolia* Scop. var. *confusa* Godr. (Caryologia, 2: 71-84, 43 figg., 1949).
74. BATTAGLIA EMILIO — L'alterazione della meiosi nella riproduzione apomittica di *Erigeron Karwinskianus* DC. var. *nucronatus* DC. (Asteraceae). (Caryologia, 2: 165-204, 91 figg., 1950).
96. MAUGINI ELENA — Ricerche cito-embriologiche sul genere *Piper*. (Caryologia, 3: 221-233, 43 figg., 1950).
105. CATELANI RITA — Ricerche cito-embriologiche su *Rudbeckia pinnata* Vent. (Asteraceae). (Caryologia, 3: 327-335, 17 figg., 1951).
111. DOLCHER TULLIO — La meiosi e lo sviluppo del gametofito nell'ovulo di *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae). (Caryologia, 4: 58-76, 74 figg., 1951).
140. MAUGINI ELENA — Ricerche cito-embriologiche su *Piper medium* Jacq. var. *ceanothifolium* (H. B. K.) Trel. et Yun. (Caryologia, 5: 282-287, 14 figg., 1953).
145. DEMI LICIA — Sulla natura germinale delle cellule ghiandolari presentanti fenomeni meiotici alla base del canale stilare nei generi *Viburnum*, *Sambucus* e *Adoxa* (Caprifoliaceae). (Caryologia, 5: 378-403, Tavv. XXVI-XXX e 12 figg., 1953).
184. BATTAGLIA EMILIO — Unusual cytological features in the apomictic *Rudbeckia Sullivantii* Boynton et Beadle. (Caryologia, 8: 1-32, 56 figg., 1955).
186. BATTAGLIA EMILIO e BREVIGLIERI NINO — Microsporogenesi regolare e irregolare in *Olea europaea* L. (Caryologia, 8: 45-68, Tavv. I-XV, 1955).
213. PAVARI FIORELLA — Ricerche embriologiche e carilogiche su *Cestrum elegans* L. (Solanaceae). (Caryologia, 9: 436-452, Tavv. XL-XLII e 33 figg., 1957).
225. GORI CHIARA — Sull'embriologia e citologia di alcune specie del genere *Reseda*. (Caryologia, 10: 391-401, 43 figg., 1957).
236. CORTINI CARMELA — Sviluppo del gametofito femminile in *Malpighia fucata* Ker-Gawl. (Malpighiaceae). (Caryologia, 11: 42-56, 26 figg., 1958).
242. PAGNI PAOLA — Ricerche cito-embriologiche su *Oenothera acaulis* Cav. (Caryologia, 11: 181-201, 26 figg., 1958).
243. BATTAGLIA EMILIO — L'evoluzione del gametofito maschile dalle Gimnosperme alle Angiosperme sulla base di recenti osservazioni in *Gnetum*. (Caryologia, 11: 217-228, 2 figg., 1958).
245. BATTAGLIA EMILIO — L'abolizione del tipo embriologico *Scilla* e la creazione dei nuovi tipi *Endymion* ed *Allium*. (Caryologia, 11: 247-252, 1 figg., 1958).
246. BATTAGLIA EMILIO — Osservazioni critiche sul tipo di sviluppo del gametofito femminile attribuito a *Scilla hyacinthoides* L. (Liliaceae). (Caryologia, 11: 253-258, 1958).
248. BATTAGLIA EMILIO and FEELEY EDWARD — The embryo sac of *Scilla pratensis* Waldst. et Kit. (Liliaceae). (Caryologia, 11: 407-414, 13 figs., 1959).

E. PROBLEMI DI MORFOLOGIA E FISILOGIA NORMALI E SPERIMENTALI ALLA LUCE DI RICERCHE CARIOLOGICHE.

(Vedere anche in D: Pubblicazioni n. 145 e 213; in I: 91, 110, 116, 151 e 166)

33. D'AMATO FRANCESCO — Cytological Consequences of Decapitations in Onion Roots. (Experientia, IV/9: 388-390, Basilea 1948).

41. D'AMATO FRANCESCO e AVANZI MARIA GRAZIA — Reazioni di natura auxinica ed effetti rizogeni in *Allium Cepa* L. Studio cito-istologico sperimentale. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 55: 161-213, Tav. II e 12 figg., 1948).
64. D'AMATO FRANCESCO e AVANZI MARIA GRAZIA — Primo contributo alla conoscenza dell'attività citologica e fisiologica delle sostanze di crescita sul testo *Allium Cepa*. (Caryologia, 2: 31-54, Tav. I e 2 figg., 1949).
73. D'AMATO FRANCESCO — Occasionale comparsa di radici altamente poliploidi in un bulbo di Cipolla. (Caryologia, 2: 160-164, 4 figg., 1950).
75. AVANZI MARIA GRAZIA — Endomitosi e mitosi a diplocromosomi nello sviluppo delle cellule del tappeto di *Solanum tuberosum* L. (Caryologia, 2: 205-222, Tav. VIII e 25 figg., 1950).
80. DOLCHER TULLIO — Sulla costituzione cariologica dei tessuti differenziati delle Leguminose. (Caryologia, 2: 339-360, Tav. XIV e 4 figg., 1950).
82. D'AMATO FRANCESCO — Differenziazione istologica per endopoliploidia nelle radici di alcune Monocotiledoni. (Caryologia, 3: 11-26, Tavv. I-III, 1950).
100. MELETTI PAOLO — Reazioni cito-istologiche ed effetti rizogeni in plantule di alcune Leguminose trattate con 2,4-D. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 57: 499-514, Tavv. VIII-IX, 1950).
107. AVANZI MARIA GRAZIA — Ricerche sulla poliploidia somatica nei tessuti differenziati della radice di alcune Graminaceae. (Caryologia, 3: 351-369, Tavv. IX-X, 1951).
113. D'AMATO FRANCESCO — New evidence on endopolyploidy in differentiated plant tissues. (Caryologia, 4: 121-144, Plates IX-XI, 1952).
123. SCARASCIA GIAN TOMMASO — Sviluppo del tappeto dell'antera in *Nicotiana Tabacum* L. var. *Bright*. (Caryologia, 5: 25-42, Tavv. I-II, 1952).
187. CASTIGLIA ELEONORA — Sulla poliploidia istologica nei vegetali: osservazioni in *Scilla obtusifolia* Poir. (Caryologia, 7: 420-437, Tav. XXX e 35 figg., 1955).
201. GORI CHIARA — Aberrazioni e ritardo di sviluppo in plantule e piante di seme invecchiato di *Vicia Faba* L. (Caryologia, 9: 76-81, Tav. XI, 1956).

F. RICERCHE SUL COMPORTAMENTO DEL NUCLEOLO DURANTE LA MITOSI.

(Vedere anche in C: Pubblicazione n. 167)

94. AVANZI MARIA GRAZIA — Osservazioni sul ciclo nucleolare in *Cassia acutifolia* Delile. (Caryologia, 3: 200-203, 1 fig., 1950).
102. GORI CHIARA — Persistenza del nucleolo durante la mitosi in *Reseda odorata* L. (Caryologia, 3: 294-298, 14 figg., 1951).
129. D'AMATO AVANZI MARIA GRAZIA — Nuove osservazioni sulla persistenza del nucleolo durante la mitosi nel genere *Cassia*. (Caryologia, 5: 133-135, 1952).
199. GORI CHIARA — Persistenza del nucleolo durante la mitosi nel genere *Reseda*. (Caryologia, 9: 54-55, 1956).
257. FABBRI FERNANDO — Contributo per l'interpretazione della persistenza nucleolare durante la mitosi in *Psilotum nudum* (L.) Beauv. (Caryologia, 13: 297-337, Tavv. XXXIX-XLII e 8 figg., 1960).

G. RICERCHE SULLA MEIOSI NEI TESSUTI SOMATICI.

(Vedere anche in D: Pubblicazione n. 145)

23. BATTAGLIA EMILIO e DOLCHER TULLIO — « Eumeiosi » e « meiosi apomeiotipica » seguita da « mitosi a diplounivalenti » nel tessuto somatico del genere *Sambucus*. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 633-641, 46 figg. 1947).

28. BATTAGLIA EMILIO — Divisione eterotipica in cellule somatiche di *Sambucus Ebulus* L. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 724-733, 14 figg., 1947).
84. BATTAGLIA EMILIO — Considerazioni sopra i più noti reperti di « fenomeni meiotici » in tessuti somatici. (Caryologia, 3: 79-112, 1 fig., 1950).

H. RICERCHE SUL PERFEZIONAMENTO DEI METODI TECNICI PER LE OSSERVAZIONI DI CITOGENETICA.

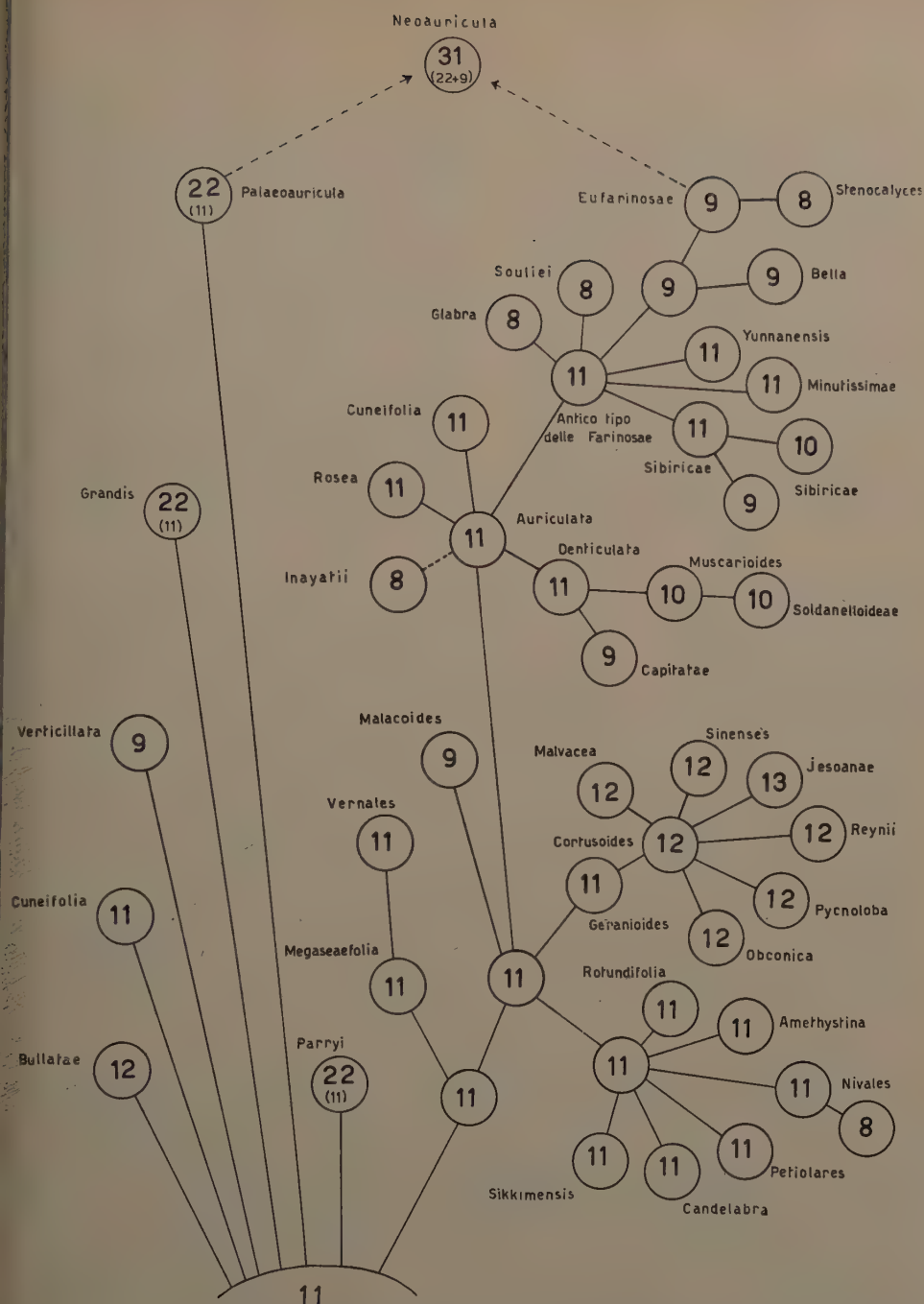
(Vedere anche in C: Pubblicazioni n. 223 e 247)

16. D'AMATO FRANCESCO — Osservazioni critiche su alcuni metodi d'impiego della reazione nucleale in citologia vegetale. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 53 (1946): 657-668, 1947).
215. BATTAGLIA EMILIO — A new « 5 minutes-fixation » in chromosome analysis. (Caryologia, 9: 368-370, 1957).
216. BATTAGLIA EMILIO — « Simultaneous » and « successive pretreatments » in chromosome analysis. (Caryologia, 9: 370-371, 1957).
217. BATTAGLIA EMILIO — A simplified feulgen method using cold hydrolysis. (Caryologia, 9: 372-373, 1957).
224. BATTAGLIA EMILIO — Metodo Feulgen in Ematologia: un procedimento semplificato (idrolisi a temperatura ambiente) e rapido (30 minuti). (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Scienze, Ser. VIII, 22: 337-340, 1957).
227. BATTAGLIA EMILIO — La sostituzione dell'idrolisi a caldo con l'idrolisi a temperatura ambiente (« idrolisi fredda ») nel metodo Feulgen. (Rendic. Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis., Ser. VIII, 22: 188-192, 1957).
230. BATTAGLIA EMILIO — La microfotografia al contrasto di fase nello studio della morfologia cromosomica. (Caryologia, 10: 46-54, Tavv. VII-XII, 1957).
231. BATTAGLIA EMILIO — Conservazione in frigorifero dei preparati temporanei lutati, di materiale colorato secondo il metodo Feulgen. (Caryologia, 10: 159-160, 1957).
249. BATTAGLIA EMILIO — Sex determination by cytological examination of salivary and urinary sediments. (Caryologia, 12: 146-150, Plate XI, 1959).
252. BATTAGLIA EMILIO — A 30 minutes procedure for staining blood and bone marrow smears by the Feulgen method. (Caryologia, 12: 186-187, 1959).

I. PROBLEMI GENERALI DI CITOGENETICA.

(Vedere anche in A: Pubblicazioni n. 88 e 152; in C: 255; in G: 84)

2. BATTAGLIA EMILIO — Sulla terminologia dei processi meiotici. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 52 (1945): 42-57, 12 figg., 1947).
21. BATTAGLIA EMILIO — Sulla terminologia dei processi mitotici. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 596-632, 7 figg., 1947).
22. BATTAGLIA EMILIO — Sulla terminologia dei processi apomittici. (Nuovo Giorn. Bot. Ital., n. s., 54: 674-696, 1947).
78. BATTAGLIA EMILIO — Sui fenomeni endomitotici: una precisazione terminologica. (Caryologia, 2: 298-300, 1 fig., 1950).
86. BATTAGLIA EMILIO — Sulla terminologia dei processi meiotici. 2° Contributo: Meiosi nei Coccidi (*Coccidae-Homoptera*). (Caryologia, 3: 47-71, 7 figg., 1950).
88. D'AMATO FRANCESCO — The chromosome breaking activity of chemical as studied by the *Allium Cepa* test. (Simposio internazionale su « le Sostanze mutagene », maggio 1949. Pubbl. Stazione Zoologica di Napoli, 22 (Suppl.): 158-170, 2 tavv., 1950).
90. D'AMATO FRANCESCO — The quantitative study of mitotic poisons by the *Allium Cepa* test: data and problems. (Protoplasma, Bd. 39, H. 3: 423-433, Wien, 1950).

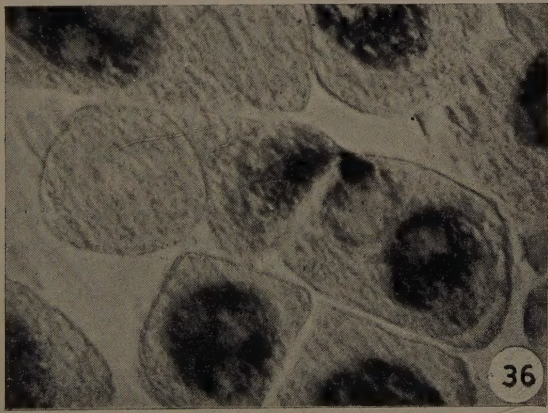
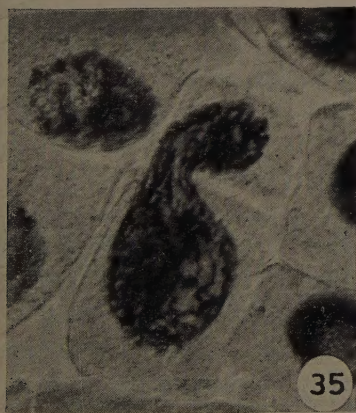
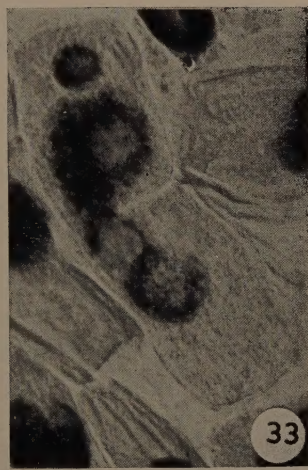
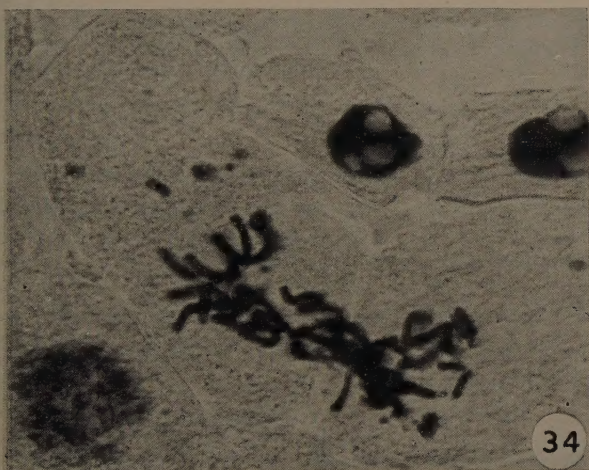
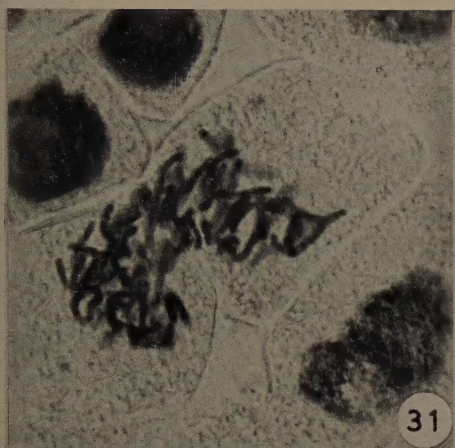


Favola VIII. - Contributi all'interpretazione della filogenesi di alcune Angiosperme - Diagramma schematico dell'evoluzione cariologica delle sezioni del genere « Primula », in base ai reperti di Bruun, Wenner e Chiarugi, ispirato, con modificazioni e aggiornamenti originali, su quello redatto da Bruun e pubblicato da Smith.
Da ALBERTO CHIARUGI, Pubblicaz. n. 195, 1956).

91. CHIARUGI ALBERTO — La poliploidia della generazione aploide femminile delle Faneae rogane. (Caryologia, 3: 149-155, 1950).
98. D'AMATO FRANCESCO — Recenti acquisizioni nel campo della chemiogenetica: I prodotti del ricambio organico come agenti mutageni. (Caryologia, 3: 249-259, 1950).
110. D'AMATO FRANCESCO — Endopolyploidy in differentiated plant tissues. (Caryologia, 4: 115-117, 1951).
116. D'AMATO FRANCESCO — Polyploidy in the differentiation and function of tissues and cells in plants. A critical examination of the literature. (Caryologia, 4: 311-358, 1952).
124. D'AMATO FRANCESCO — The problem of the origin of spontaneous mutations. (Caryologia, 5: 1-13, 1952).
125. D'AMATO FRANCESCO — The cytological study of chemical mutagens. (Genetica Iberica, 4: 3-18, with 1 plate, 1952).
131. BATTAGLIA EMILIO — Terminologia cariológica: Cariogramma, Cariotipo, Semicariotipo, Aplocariotipo. (Atti Soc. Tosc. Sci. Natur., Memorie, Ser. B, 59: 122-129, 1953).
132. BATTAGLIA EMILIO — Sul significato e uso del termine « Sat Cromosoma » (Atti Soc. Tosc. Sc. Natur., Memorie, Ser. B, 59: 162-165, 1953).
133. BATTAGLIA EMILIO — Appaiamento cromosomico primario, appaiamento cromosomico secondario ed appaiamento cromatidico secondario nella meiosi. (Atti Soc. Tosc. Sci. Natur., Memorie, Ser. B, 59: 166-171, 1953).
146. D'AMATO FRANCESCO — Cytological and genetic effects of acridines. (Radiobiology Symposium in Århus, 16-18 luglio 1953, Acta Radiologica, Suppl. 116: 701-702, Stockholm, 1954).
147. D'AMATO FRANCESCO — Considerazioni sulla inibizione selettiva dei vari stadi della mitosi. (Atti della Riunione della Società Italiana di Chemioterapia sugli antimitotici, Milano 24-25 ottobre 1953; Giorn. Ital. di Chemioter., 1: 129-134, 1954).
148. D'AMATO FRANCESCO — Action des facteurs physique et chimiques sur la mitose. (Actes du VIII Congrès International de Botanique, Paris, Rapport et Communications, Sect. 9: 1-9, 1954).
150. CHIARUGI ALBERTO — Citogenetica forestale (Annali Accad. Ital. Sc. Forest., 3: 27-77, 1955).
151. CHIARUGI ALBERTO — La poliploidia somatica nelle piante. (Atti del IX Congresso Internazionale di Genetica, Bellagio, Italia, 24-31 agosto 1953, in « Caryologia », suppl. al 6: 488-520, 1954).
161. CHIARUGI ALBERTO — I giardini alpini e la sperimentazione sul miglioramento genetico delle piante officinali. (Relazione al IV Congresso Nazionale di Erboristeria, Modena, 12-14 giugno 1954. Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante officinali, Olii Vegetali, Saponi - E.P.P.O.S. - 36: 626-634, 1954).
162. D'AMATO FRANCESCO — Données et perspectives des recherches sur les actions antimitotiques et mutagènes. (Discussion avec les participants au colloque). (Actes du VIII Congr. Int. Botanique, Rapp. et Commun., 1-4, Paris, 1954).
165. D'AMATO FRANCESCO — Il Simposio su « Action des facteurs physiques et chimiques sur la mitose » all'VIII Congresso Internazionale di Botanica (Parigi, luglio 1954). (Caryologia, 6: 338-341, 1954).

Tavola IX. - *Contributi allo studio dell'azione citogenetica di alcune sostanze organiche sulle cellule meristematiche degli apici radicali del test « Allium cepa »* - Qualche aspetto degli effetti indotti da alcuni derivati della Chinolina.

(Da ALESSANDRA MILOSKY, Pubblicaz. n. 254, 1960).



166. D'AMATO FRANCESCO — A brief discussion on « Endomitosis ». (Caryologia, 6: 341-345, 1954).
170. D'AMATO F. and HOFFMANN-OSTENHOF O. — Metabolism and spontaneous mutations in plants. (Advances in Genetics, 8: 1-28, 1956).
188. BATTAGLIA EMILIO — A New Type of Segregation of the Sex Chromosomes in *Dysdercus Koenigii* Fabr. (Hemiptera-Pyrrhocoridae). A Critical Note. (Caryologia, 8: 205-213, 1955).
189. BATTAGLIA EMILIO — The concept of pseudopolyploidy. (Caryologia, 8: 214-220, 1955).
190. BATTAGLIA EMILIO — A Consideration of a New Type of Meiosis (Mis-meiosis) in Juncaceae (*Luzula*) and Hemiptera. (Bull. Torrey Bot. Club, 82: 383-396, 3 figs., 1955).
191. BATTAGLIA EMILIO and BOYES J. W. — Post-reductional meiosis: its mechanism and causes. (Caryologia, 8: 87-134, 10 figs., 1955).
192. BATTAGLIA EMILIO — Chromosome morphology and terminology. (Caryologia, 8: 179-187, 12 figs., 1955).
194. D'AMATO FRANCESCO — Il I° Simposio della « Gesellschaft für Genetik » di Tübingen (26-28 Ottobre 1955). (Caryologia, 8: 323-324, 1956).
253. CHIARUGI ALBERTO — L'evoluzione del sistema genetico a livello sopraspecifico. (Accademia Nazionale dei Lincei: « Problemi di Scienza e Cultura », Quaderno n. 47: 237-271, 1960).

BIBLIOGRAFIA

- CHIARUGI A., 1950. — « Centro di studio per la citogenetica vegetale ». *Attività svolta durante gli anni 1947-48, 1948-49, 1949-50*. La Ricerca Scientifica, **20**: 1417-1441.
- , 1953. — « Centro di studio per la citogenetica vegetale ». *Attività svolta durante gli anni 1950-51 e 1951-52*. La Ricerca Scientifica, **23**: 51-56.
- , 1957. — « Centro di studio per la citogenetica vegetale ». *Attività svolta durante gli anni 1952-57*. La Ricerca Scientifica, **27**: 3265-3291.

SUMMARY

The activity of the « Centre of study of plant cytogenetics » of the National Council of Research is briefly outlined from its origin (1947) and the aims of this Centre as stated by its founder, Alberto Chiarugi, are clearly pointed out.

Follows, according to subjects, a complete list of the 257 publications which show the 13-years activity of the Centre (1947-1960).

RIASSUNTO

Dopo una premessa in cui vengono messi in luce gli intenti con i quali Alberto Chiarugi fondò, nel 1947, il « Centro di studio per la citogenetica vegetale » del Consiglio Nazionale delle Ricerche, e dopo brevi cenni di storia del Centro stesso, viene riportato, suddiviso per argomenti, l'elenco completo delle 257 pubblicazioni che illustrano 13 anni di attività del Centro (1947-1960).

Direttore responsabile: Dr. FERNANDO FABBRI

Decreto del Tribunale di Firenze n. 478 in data 13 luglio 1951 - Tip. Classica - Firenze

CARYOLOGIA, periodico fondato da **ALBERTO CHIARUGI**, è dedicata alla pubblicazione di ricerche originali di citologia, di citosistemica e di genetica su piante e animali. Ogni volume viene pubblicato annualmente suddiviso in tre fascicoli e comprende circa 400-500 pagine.

MANOSCRITTI - Le memorie possono essere redatte in italiano, in francese o in inglese e devono essere corredate di un riassunto in lingua italiana e in lingua inglese. Esse devono essere presentate nella forma definitiva e dattiloscritte. Il nome degli Autori citati nel testo deve essere seguito, fra parentesi, dall'anno in cui il lavoro citato è stato pubblicato. La bibliografia deve essere compilata sotto forma di lista in ordine alfabetico, attenendosi a questo schema: cognome dell'Autore citato, iniziale del nome, anno di pubblicazione del lavoro, titolo nella lingua originale, titolo del periodico, indicazione del volume, pagina in cui il lavoro inizia e pagina in cui termina.

Gli Autori sono responsabili del contenuto e dello stile delle loro memorie.

ILLUSTRAZIONI - Nel preparare le figure e le tavole destinate alla pubblicazione, gli Autori sono pregati di tener presenti le dimensioni della pagina stampata (mm 125×180).

ESTRATTI - Gli Autori ricevono gratuitamente 50 estratti; possono ottenerne un numero superiore a pagamento.

ABBONAMENTI - Il prezzo di abbonamento è di Lit. 4.800 al volume, comprese le spese postali.

Le memorie, gli abbonamenti e la corrispondenza relativa devono essere inviate al seguente indirizzo: Dr. Fernando Fabbri, Redazione di «Caryologia», Via Lamarmora, 4 - Firenze.

CARYOLOGIA, a periodical founded by **ALBERTO CHIARUGI**, is devoted to the publication of original research in plant and animal cytology, cytosystematics and genetics. One volume, of about 400-500 pages, is issued yearly and it consists of three numbers.

MANUSCRIPTS - Contributions in Italian, English and French are accepted; they should be typewritten and in complete and final form for publication. English and Italian summaries should complete the paper. The name of the Authors referred to in the Manuscript should be followed by the year, in parenthesis, in which the paper was published. The references should be arranged alphabetically and according to the following order: Author's surname, name initials, year of publication, original title of the work, journal name, volume number, inclusive pages.

Authors are responsible for the content and style of their contributions.

TABLES AND FIGURES - In preparing tables and figures for publication the size of the printed page, mm 125×180, should be kept in mind. The figure legends should be submitted on a separate page.

REPRINTS - The Authors will be furnished, free of charge, with 50 reprints. Additional reprints may be obtained at cost and the order should be written on the proofs.

SUBSCRIPTION RATE - Lit. 4,800 a year, postage included.

Papers, subscriptions, correspondence with reference to editorial matters should be addressed to the Associate Director, Dr. Fernando Fabbri, «Caryologia», Via Lamarmora, 4 - Firenze, Italy.

INDICE

| | |
|--|-----------|
| STEFANI RENZO — La formazione dei foglietti embrionali, l'origine dell'epitelio intestinale e la determinazione della linea germinale femminile nell' <i>Haploembia solieri</i> | pp. 1-30 |
| MARTINOLI GIUSEPPE — A summary of the effects of ionizing and UV radiations on root-tips of <i>Scilla obtusifolia</i> Poir. | » 31-34 |
| BHATNAGAR A. N. — Chromosome cytology of a snake, <i>Lycodon aulicus</i> L. (<i>Colubridae</i> , <i>Ophidia</i>) | » 35-42 |
| NOBILI RENZO — L'azione del gene <i>am</i> sull'apparato nucleare di <i>Paramecium aurelia</i> durante la riproduzione vegetativa e sessuale in relazione all'età del clone ed alla temperatura di allevamento degli animali | » 43-58 |
| VOSA CANIO G. — Spontaneous asynapsis in <i>Tradescantia</i> | » 59-62 |
| SRIVASTAVA M. D. L. and UMA AGRAWAL — Absence of chiasmata and formation of a complex chromosomal body in the spermatogenesis of the scorpion <i>Palamnaeus longimanus</i> | » 63-77 |
| CESCA GIULIANO — Ricerche cariologiche ed embriologiche sulle <i>Euphorbiaceae</i> . I - Su alcuni biotipi di <i>Euphorbia dulcis</i> L. della Toscana | » 79-96 |
| SHARMA ARUN KUMAR and ARCHANA SHARMA — Chromosome studies of some varieties of <i>Narcissus tazetta</i> L. | » 97-106 |
| VOSA CANIO G. — A modified aceto-orcein method for pollen mother cells | » 107-110 |
| RUGGERI CECILIA — Contributo alla cariologia del genere <i>Eucalyptus</i> (<i>Myrtaceae</i>) | » 111-120 |
| ROY S. K. — Somatic chromosomes of <i>Aspidistra</i> Ker-Gawl | » 121-128 |
| CESCA GIULIANO — Ricerche embriologiche su <i>Rudbeckia missouriensis</i> Engelm. (<i>Compositae</i>) | » 129-139 |
| PAL N. — Cytological studies on the genus <i>Russelia</i> | » 141-150 |
| MACCHIA F. e G. PACUCCI — Sul numero cromosomico del <i>Cucumis</i> coltivato nelle Puglie con il nome di « Carosello » | » 151-153 |
| BANERJEE BARUNDEB — Chromosome morphology during the spermatogenesis of <i>Odontotermes redemanni</i> (Wasmann) | » 155-158 |
| DAS B. C. — Cytological studies on <i>Morus indica</i> L. and <i>Morus laevigata</i> Wall. | » 159-162 |
| NUTI-RONCHI VITTORIA and FRANCESCO D'AMATO — New data of chromosome breakage by acridine orange in the <i>Allium</i> test | » 163-165 |
| FABRI FERNANDO — Tredici anni di attività del « Centro di studio per la citogenetica vegetale » del C.N.R. sotto la direzione di Alberto Chiarugi | » 167-192 |